

# **Expression ausgewählter Enzyme und phylogenetische Untersuchung der pflanzlichen Aminosäurebiosynthese**

**Von der** Gemeinschaftlichen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wihelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
**genehmigte**  
D i s s e r t a t i o n

von Andrea Hansen  
aus Schleswig

1. Referent: Prof. Dr. William F. Martin  
2. Referent: Prof. Dr. Ralf R. Mendel  
eingereicht am: 17.12.2001  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 31.5.2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Herbizide . . . . .	5
1.1.1 Herbizide Targets im Aminosäurestoffwechsel . . . . .	6
1.2 Biosynthese von Aminosäuren in Pflanzen . . . . .	7
1.2.1 Die Glutamatfamilie . . . . .	8
1.2.2 Die Aspartatfamilie . . . . .	16
1.2.3 Die Pyruvatfamilie . . . . .	22
1.2.4 Die Phosphoglyceratfamilie . . . . .	25
1.2.5 Die Phosphoenolpyruvatfamilie . . . . .	27
1.3 Ziele der Arbeit . . . . .	33
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1 Geräte . . . . .	35
2.2 Hard- und Software . . . . .	36
2.3 Chemikalien und Enzyme . . . . .	36
2.4 Lösungen und Medien . . . . .	37
2.5 Pflanzenmaterial . . . . .	37
2.6 Vektoren und Stämme . . . . .	37
2.6.1 Klonierungsvektoren . . . . .	37
2.6.2 Expressionsvektoren . . . . .	38
2.7 Präparation von DNA . . . . .	38
2.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	38
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	38
2.7.3 Differentielle DNA-Aufreinigung . . . . .	39
2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	39
2.9 Isolierung von mRNA aus Pflanzen . . . . .	40
2.9.1 Herstellung einer cDNA-Bank . . . . .	41
2.10 Nachweis von Rekombinanten durch die Filter-Hybridisierung . . . . .	41
2.10.1 Radioaktive Markierung einer Oligosonde . . . . .	43

2.11	Radioaktive Sequenzierung . . . . .	44
2.12	Subklonierung für die heterologe Expression . . . . .	46
2.13	Aufarbeitung rekombinanter Proteine . . . . .	46
2.13.1	Expression in <i>E. coli</i> . . . . .	47
2.13.2	Aufreinigung über Ni-NTA Agarose . . . . .	47
2.13.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	48
2.13.4	Western-Blot . . . . .	48
2.14	Messung der Enzymaktivität . . . . .	49
2.14.1	N-Acetylglutamatkinase . . . . .	49
2.14.2	Homoserinkinase . . . . .	51
2.14.3	Threonindehydratase . . . . .	55
2.14.4	Der Z-Faktor . . . . .	57
2.15	Methoden der Bioinformatik . . . . .	58
2.15.1	Sequenzanalyse . . . . .	58
2.15.2	Datenbankvergleich . . . . .	58
2.15.3	Multiple Alignments . . . . .	58
2.15.4	Phylogenetische Analysen . . . . .	60
2.15.5	PERL und MySQL . . . . .	61
2.15.6	Automatische phylogenetische Analyse . . . . .	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
3.1	Klonierung der Gene . . . . .	69
3.1.1	Homoserinkinase, Threoninsynthase und Threonindehydratase . . . . .	69
3.1.2	N-Acetylglutamatkinase . . . . .	70
3.2	Expression der Enzyme in <i>E. coli</i> . . . . .	70
3.2.1	Expression mit und ohne Transitpeptid . . . . .	70
3.3	Entwicklung eines HTS-fähigen Assays . . . . .	74
3.3.1	Die N-Acetylglutamatkinase . . . . .	74
3.3.2	Homoserinkinase . . . . .	76
3.3.3	Threonindehydratase . . . . .	79
3.4	Die Phylogenie der Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel . .	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1	Etablierung der HTS-Assays . . . . .	85
4.1.1	Die N-Acetylglutamatkinase . . . . .	85
4.1.2	Die Homoserinkinase . . . . .	86
4.1.3	Die Threoninsynthase . . . . .	88
4.1.4	Die Threonindehydratase . . . . .	88
4.2	Die Phylogenie der Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel . .	90
4.2.1	Die Glutamatfamilie . . . . .	90

4.2.2	Die Aspartatfamilie . . . . .	106
4.2.3	Die Pyruvatfamilie . . . . .	113
4.2.4	Die Phosphoglyceratfamilie . . . . .	117
4.2.5	Die Phosphoenolpyruvatfamilie . . . . .	121
4.2.6	Der Ursprung der Enzyme gleicht einem Mosaik . . . . .	128
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>130</b>
<b>Anhang</b>		<b>155</b>
<b>A ML-Bäume der Enzyme</b>		<b>155</b>
<b>B Sequenzen verwendeter Primer</b>		<b>236</b>
B.1	Oligomere für die Klonierung . . . . .	236
B.2	PCR-Primer . . . . .	236
B.2.1	Amplifizierung der N-Acetylglutamatkinase . . . . .	236
B.2.2	Amplifizierung für die Expression . . . . .	236

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Enzyme aus der Aminosäurebiosynthese aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und in einem heterologen Expressionssystem exprimiert. Für die aufgereinigten Enzyme wurden Aktivitätstests entwickelt, die in einem Hochdurchsatzscreening eingesetzt wurden, um neue Wirkstoffe für die Entwicklung von Herbiziden zu identifizieren.

Anschließend wurden alle Stoffwechselwege der pflanzlichen Aminosäurebiosynthese anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* in einem automatisierten Ansatz phylogenetisch untersucht. Aus den Proteinsequenzen von zehn Archaeobakterien, 42 Eubakterien, vier Eukaryoten und 22 Organellengenomen (21 Plastiden und ein Mitochondrion) wurde eine Datenbank erstellt, in der Homologe zu den pflanzlichen Enzymen über eine Blastsuche identifiziert wurden. Für jedes Enzym wurde aus den homologen Sequenzen ein multiples Alignment erstellt und ein phylogenetischer Baum nach dem Maximum-Likelihood Prinzip errechnet.

Die Topologien, die sich für die Enzyme ergaben, wurden darauf untersucht, in welcher Beziehung das pflanzliche Protein zu eubakteriellen, archaeobakteriellen und cyanobakteriellen Homologen steht. Es zeigte sich, daß der evolutionäre Ursprung der pflanzlichen Enzyme in der Aminosäurebiosynthese sehr mannigfaltig ist. Es werden sowohl archaeobakterielle als auch cyanobakterielle und eubakterielle Vorläufer der Enzyme postuliert.

Die Herkunft der Enzyme ist scheinbar unabhängig von der Lokalisation der Enzyme in der Zelle, da sowohl einige plastidäre Enzyme eine eubakterielle Herkunft zeigen als auch einige mitochondriale Enzyme eine cyanobakterielle Herkunft.

Die Herkunft der Enzyme ist scheinbar auch unabhängig vom Stoffwechselweg, da in allen untersuchten Stoffwechselwegen Enzyme mit unterschiedlicher evolutionärer Herkunft zu finden sind. Selbst die Untereinheiten eines Enzyms zeigen nicht immer den gleichen evolutionären Ursprung. Die Acetolactatsynthese aus dem Syntheseweg der verzweigtkettigen Aminosäuren besteht z. B. aus einer cyanobakteriellen und einer eubakteriellen Untereinheit. Auch Polypeptide treten z.T. als eine Fusion aus Vorläufern verschiedenen evolutionären Ursprungs auf. Ein Beispiel dafür ist die  $\Delta$ -Pyrrolin-5-carboxylatsynthetase aus der Prolinsynthese. Sie besteht aus der cyanobakteriellen GSA-Reduktase und der eubakteriellen  $\gamma$ -Glutamatinase.

Die pflanzliche Aminosäuresynthese erscheint in dieser Analyse als ein Mosaik aus den Genen der Endosymbionten und der archaeobakteriellen Vorläuferzelle der heutigen Eukaryoten.

# 1

## Einleitung

### 1.1 Herbizide

In der modernen Landwirtschaft werden nur wenige Sorten intensiv angebaut, die auf bestimmte Merkmale wie Ertrag und Resistenz hin gezüchtet wurden und nur durch den Einsatz von speziellen Düngemitteln und Pestiziden den gewünschten hohen Ertrag liefern. Zu den Pestiziden gehören alle Mittel, die zur Bekämpfung von pflanzlichen und tierischen Schädlingen zum Einsatz kommen. Herbizide werden seit den 40er Jahren in der Landwirtschaft verwendet [Moreland, 1993].

Die meisten Herbizide wirken auf metabolische Reaktionen, die pflanzenspezifisch und oft im Chloroplasten lokalisiert sind. Ein Hauptangriffspunkt der Herbizide ist daher die Photosynthese [Devine et al., 1993], in der verschiedene Wirkungsmechanismen als Ursache in Frage kommen. Zum einen kann die Biogenese des Photosyntheseapparates betroffen sein, zum anderen der photosynthetische Elektronentransport. Beispielsweise ist das D1-Protein des Photosystem II das Zielprotein (Target) vieler Herbizide, z. B. vom dem Harnstoffderivat DCMU und dem Triazin Atrazin [Hock and Elstner, 1995].

Bis in die 80er Jahre hinein stellte man Herbizide aus Chemikalien her, ohne etwas über ihren genauen Wirkort in der Pflanze zu wissen. Die Chemikalien wurden *in vivo* an der Pflanze ausgetestet. Heutzutage werden Herbizide wesentlich zielorientierter entwickelt. Am Anfang wird ein Zielprotein ausgesucht, auch Target genannt, gegen das das zukünftige Herbizid wirken soll. Statt mit der ganzen Pflanze zu arbeiten, wird das Target kloniert und in prokaryotischen (z.B. *E. coli*) oder eukaryotischen (z. B. *S. cerevisiae*) Systemen exprimiert. Für jedes Target wird ein spezifisches *in vitro* Testsystem entwickelt. Aufgrund der meist einfachen Durchführbarkeit stehen hier enzymatische Tests im Vordergrund, aber auch Bindungsstudien spielen eine immer größere Rolle, da sich nicht alle Tar-

gets mit einem einfachen enzymatischen Assay auf ihre Funktion hin überprüfen lassen. Eine andere Möglichkeit sind zellbasierte Assays, die z. B. für Rezeptoren gut geeignet sind. Dazu wird das Target in eukaryotischen Zellen exprimiert und *in vivo* getestet. Da die genannten Assays in miniaturisierter Form in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, können innerhalb kürzester Zeit Hunderttausende von Substanzen getestet werden. Das automatisierte Testverfahren wird Hochdurchsatzscreening (High-throughput Screening, HTS) genannt [Ridley et al., 1998]. Die Verbindungen, die im HTS eine Wirkung zeigen, werden anschließend auf ihre biologische Wirkung an der Pflanze *in vivo* getestet.

Durch die Automatisierung im HTS steigt der Anspruch an die Qualität und Durchführbarkeit des Testsystems. Der Assay muß vor allem reproduzierbar sein. Es dürfen keine großen Schwankungen in der Signalstärke auftreten. Inhibitorische Substanzen müssen aufgrund einer hohen Sensitivität des Assays leicht und eindeutig detektierbar sein. Für die Validierung eines HTS-Assays wurde von Zhang et al. [1999] der sogenannte Z-Faktor eingeführt. Dieser statistische Parameter gibt Auskunft über die Qualität des Testsystems.

### 1.1.1 Herbizide Targets im Aminosäurestoffwechsel

Neben der Photosynthese als Wirkort sind auch andere essentielle Stoffwechselwege in Pflanzen für die Entwicklung von Herbiziden von Bedeutung. Dazu gehört auch der Aminosäurestoffwechsel. Im Gegensatz zu tierischen Organismen können Pflanzen alle proteinogenen Aminosäuren selbst synthetisieren. Daher sind viele Enzyme in diesem Stoffwechsel einzig in Pflanzen (und Mikroorganismen) zu finden und dadurch potentielle Targets für Herbizide [Devine et al., 1993].

Das wohl bekannteste Herbizid, das in die Aminosäuresynthese der Pflanzen eingreift, ist Glyphosat (Handelsname Roundup) [Steinrücken and Amrhein, 1980, Ye et al., 2001]. Es wirkt hemmend auf die EPSP-Synthase (5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase). Die EPSP-Synthase ist das vorletzte Enzym im Shikimatweg, der zu den aromatischen Aminosäuren führt. Sie katalysiert die Bildung von EPSP aus Shikimatphosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP). Ist Glyphosat vorhanden, so bindet es an den Komplex aus Enzym und Shikimatphosphat. Das PEP kann nicht gebunden werden, eine Synthese von EPSP unterbleibt. Ein anderes erfolgreiches Herbizid ist Phosphinotricin, besser bekannt unter dem Handelsnamen Basta. Es wirkt auf die Glutamatsynthetase (GS), die als Schlüsselenzym in der Fixierung von Ammonium in der Pflanze essentiell ist. Ohne den Einfluß von Basta kann die GS Ammonium auf Glutamat übertragen. Appliziertes Basta wirkt als Substratanalogon und hemmt dadurch die Ammoniumfixierung



[Buchanan et al., 2000].

Dies sind nur zwei Beispiele für die erfolgreiche Entwicklung von Herbiziden mit Wirkorten in der Aminosäuresynthese. Es gibt noch viele andere Enzyme, die bereits als Zielprotein von Herbiziden untersucht worden sind. Da noch nicht alle pflanzlichen Enzyme in diesen Stoffwechselwegen charakterisiert wurde, kann man weitere vermuten.

Es ist nicht zwingend notwendig, daß das Zielprotein eines Herbizids nur bei Pflanzen vorkommt und in tierischen Organismen nicht zu finden ist. Voraussetzung ist allerdings, daß sich die Enzyme hinsichtlich ihres Aufbaus unterscheiden. Auch wenn Enzyme die gleiche Reaktion katalysieren, so können sie sehr verschieden in bezug auf Struktur und Regulation sein. Der Grund dafür kann unter anderem durch einen unterschiedlichen evolutionären Ursprung sein. Da die Aminosäuresynthese bei Pflanzen nahezu vollständig im Chloroplasten abläuft und der Chloroplast ursprünglich ein Cyanobakterium [Mereschkowsky, 1905] war, liegt es nahe, daß die Enzyme in diesem Organell aus dem Symbionten stammen. In tierischen Organismen hingegen werden die nicht-essentiellen Aminosäuren im Cytosol und im Mitochondrion synthetisiert. Das Mitochondrion ist ursprünglich ein  $\alpha$ -Proteobakterium gewesen [Gray, 1998]. Daher wird man hier einen anderen evolutionären Ursprung postulieren. Die Identifizierung derartiger Targets erfordert eine phylogenetische Analyse des Targets bzw. des Stoffwechselweges.

## 1.2 Biosynthese von Aminosäuren in Pflanzen

Pflanzen assimilieren anorganischen Stickstoff in die Transport-Aminosäuren Glutamat und Glutamin und Aspartat und Asparagin. Sie nehmen Nitrat aus der Umgebung auf und reduzieren dieses mit Hilfe der Nitratreduktase zu Nitrit. Das Nitrit wird von der Nitritreduktase zu Ammonium reduziert. Freiwerdendes Ammonium wird durch die Glutaminsynthetase an Glutamat gebunden und steht dadurch der Biosynthese von Aminosäuren und allen anderen stickstoffhaltigen Metaboliten zur Verfügung.

Die Biosynthese der Aminosäuren in Pflanzen ist zum einen wichtig, um die Bausteine für die Proteinbiosynthese bereitzustellen. Zum anderen sind die Aminosäuren jedoch auch Vorläufer für viele Sekundärstoffe. So entstehen z. B. aus den aromatischen Aminosäuren Lignin, Flavonoide, Plastochinon und Alkaloide, aus Glutamat über Protoporphyrin Cytochrom und Chlorophyll.

Im folgenden werden alle bekannten Enzyme des Aminosürestoffwechsels der Pflanzen kurz vorgestellt. Dazu wurden die Aminosäuren in Familien eingeteilt. Die Familien enthalten nicht immer Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften, sondern richten sich einzig und allein nach den Stoffwechselprodukten, die für ihre Synthese notwendig sind. Die Abbildung 1.1 gibt einen groben Überblick über den Syntheseweg der Aminosäuren und die Mitglieder in den fünf Familien. Die Kohlenstoffskelette, die für die Synthese der Aminosäuren eingesetzt werden, stammen aus der Glykolyse, der Photosynthese, dem oxidativen Pentosephosphatweg und dem Citratzyklus.

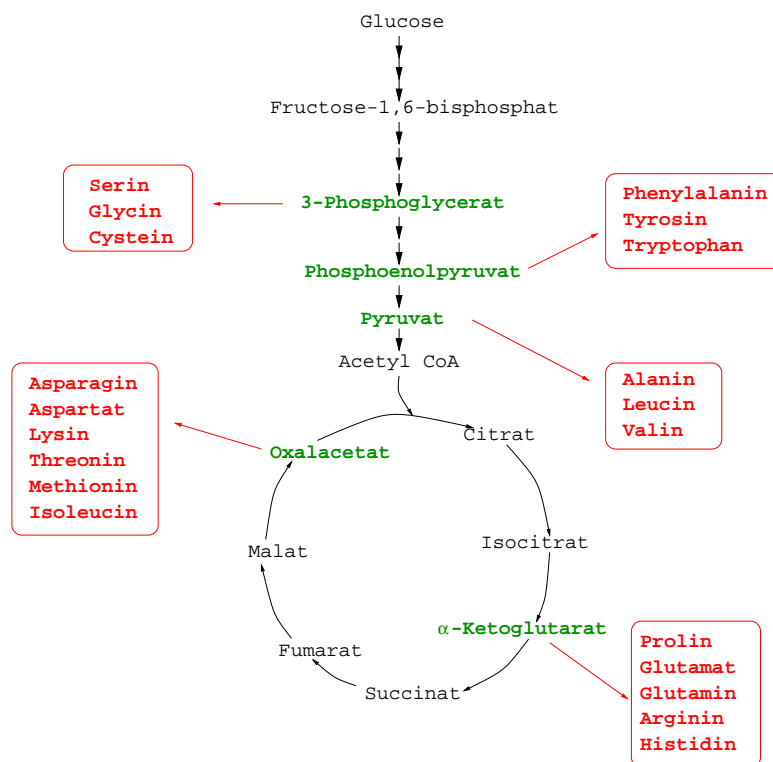


Abbildung 1.1: Schematischer Überblick über die Synthese der Aminosäuren in Pflanzen, verändert nach Buchanan et al. [2000]

### 1.2.1 Die Glutamatfamilie

Die Glutamatfamilie besteht aus den Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Prolin, Arginin und Histidin. Bis auf Histidin ist allen gemeinsam, daß sie ausgehend vom  $\alpha$ -Ketoglutarat aus dem Glutamat entstehen. In der Biosynthese von Histidin

spielt Glutamat als Stickstofflieferant ein Rolle.

### Synthese von Glutamat - der GOGAT-GS-Zyklus

Pflanzen assimilieren anorganischen Stickstoff nach der Reduktion zu Ammonium in die Aminosäuren Glutamat und Glutamin. Essentiell für diese Reaktion ist das Zusammenspiel der Glutaminsynthetase (**GS**) und der Glutamin-2-oxoglutarat-aminotransferase (**GOGAT**, Glutamatsynthase). Die Rolle der Glutamatdehydrogenase (**GDH**) ist dabei noch nicht geklärt worden (siehe Abbildung 1.2).

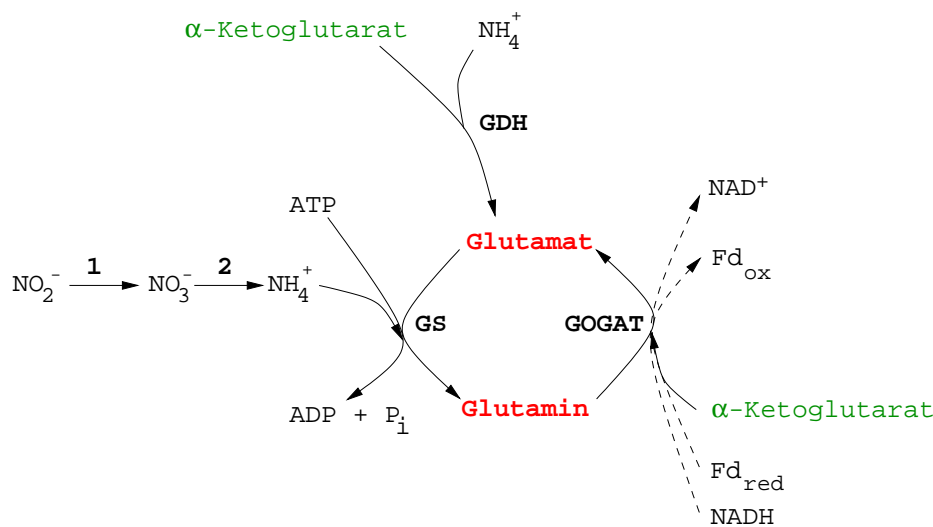


Abbildung 1.2: Die primäre Stickstoffassimilation in Glutamat und Glutamin. Die gestrichelten Linien zeigen an, daß es eine Ferredoxin- und eine NADH-abhängige GOGAT gibt. 1: Nitratreduktase, 2: Nitritreduktase, **GS**: Glutaminsynthetase, **GOGAT**: Glutamatsynthase, **GDH**: Glutamatdehydrogenase (verändert nach [Lam et al., 1995])

Die **Glutaminsynthetase** (**GS**, 6.3.1.2) katalysiert die ATP-abhängige Assimilation von Ammonium in Glutamin, wobei Glutamat als Substrat verwendet wird. Pflanzen besitzen verschiedene Isoenzyme der Glutaminsynthetase: eine cytosolische Form (**GS1**) und eine plastidäre (**GS2**) [Finnemann and Schjoerring, 2000]. Bei *Arabidopsis thaliana* findet man eine plastidäre **GS2** und mehrere cytosolische **GS1**-Isoformen, beide sind kernkodiert [Oliveira and Coruzzi, 1999]. In den meisten Pflanzen ist die **GS2** die häufigste Form, ihre Aufgabe ist die Ammoniumassimilation. **GS1** ist mit der Stickstoffassimilation in den Wurzelknöllchen von Leguminosen assoziiert und taucht in den Wurzeln vieler Pflanzen auf [Lancien et al., 2000]. Sie ist vermutlich auch an der Stickstoffmobilisierung (z.B.

während der Keimung) beteiligt. Alle Isoformen der GS sind Mitglieder einer Genfamilie, sie werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert [Dubois et al., 1996, Lam et al., 1996, Avila et al., 2001]. Die Glutamatsynthetasefamilie aus *Arabidopsis thaliana* wurde von Peterman and Goodman [1991] untersucht und aus *Brassica napus* von Ochs et al. [1999].

Die **Glutamatsynthase** (Glutamin-2-oxoglutarat-aminotransferase, GOGAT) katalysiert den reduktiven Transfer einer Aminogruppe von Glutamin auf  $\alpha$ -Oxoglutarat. In höheren Pflanzen existiert die GOGAT in zwei Formen: Ferredoxin-abhängig (Fd-GOGAT, EC 1.4.1.7) und NADH-abhängig (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14) [Trepp et al., 1999]. Die NADH-GOGAT ist primär in den Plastiden in nicht-photosynthetischen Geweben lokalisiert, während man Fd-GOGAT in erster Linie in den Plastiden der Blättern vorfindet [Lam et al., 1996]. Die Fd-GOGAT aus *Arabidopsis* wurde von Suzuki and Rothstein [1997] isoliert.

Von der **Glutamatdehydrogenase** (GDH) wurden in Pflanzen zwei Formen gefunden: eine NADH-abhängige in Mitochondrien (1.4.1.2) und eine NADPH-abhängige in den Plastiden (1.4.1.4) [Lam et al., 1996]. Man ist sich jedoch nicht einig, ob es sich hier um eine bispezifische NAD(P)H-GDH (1.4.1.3) oder um eine monospezifische NADPH-GDH (1.4.1.4) handelt. Die GDH kommt in allen Organismen vor und katalysiert sowohl die Synthese als auch den Abbau von Glutamat. Zur Synthese katalysiert die GDH die Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, zum Abbau die Deaminierung von Glutamat, wobei  $\alpha$ -Ketoglutarat entsteht und Ammonium frei wird [Buchanan et al., 2000]. In *Arabidopsis* gibt es zwei NADH-GDHs: GDH1 und GDH2 [Turano et al., 1997]. GDH1 und GDH2 bilden zusammen ein aktives Heterohexamer, wird GDH1 ausgeschaltet, so entsteht ein aktives Homohexamer aus GDH2 [Melo-Oliveira et al., 1996]. Die mitochondriale GDH spielt vermutlich bei der Reassimilation des Ammoniums aus der Photorespiration eine Rolle [Lam et al., 1996].

## Biosynthese von Prolin

In Pflanzen wird Prolin in zwei verschiedenen Stoffwechselwegen synthetisiert. Das Ausgangsprodukt ist entweder Glutamat oder Ornithin (siehe Abbildung 1.3). Der Weg, der von Glutamat ausgeht, entspricht der Prolinsynthese in *E.coli*.

Das erste Enzym, die **Pyrrolin-5-carboxylat-synthetase** (P5CS) ist in Pflanzen ein bifunktionelles Enzym: Es besteht aus der NADPH-abhängigen  $\gamma$ -Glutamatsemialdehydreduktase (GPR, **GSA-Reduktase**, 1.2.1.41) und der  $\gamma$ -**Glutamatkina**se (GK, 2.7.2.11). Die Kinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung

von Glutamat, das  $\gamma$ -Glutamatphosphat wird dann von der GSA-Reduktase in Glutamatsemialdehyd umgewandelt. Dieses zyklisiert spontan zu Pyrrolin-5-carboxylat. In *Arabidopsis* hat man zwei Gene gefunden, die für dieses Enzym codieren [Strizhov et al., 1997]. Während die beiden Gene in *Arabidopsis* sehr ähnlich sind, wurden in *Lycopersicum* zwei Gene gefunden, die vermutlich von unterschiedlicher evolutionärer Herkunft sind [Fujita et al., 1998].

Der letzte Schritt in der Prolinsynthese wird von der NADPH-abhängigen **Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase** (P5C-Reduktase, 1.5.1.2) katalysiert. Sie wandelt das Pyrrolin-5-carboxylat in Prolin um. Es konnte nur ein Gen für dieses Enzym in *Arabidopsis* gefunden werden [Verbruggen et al., 1993].

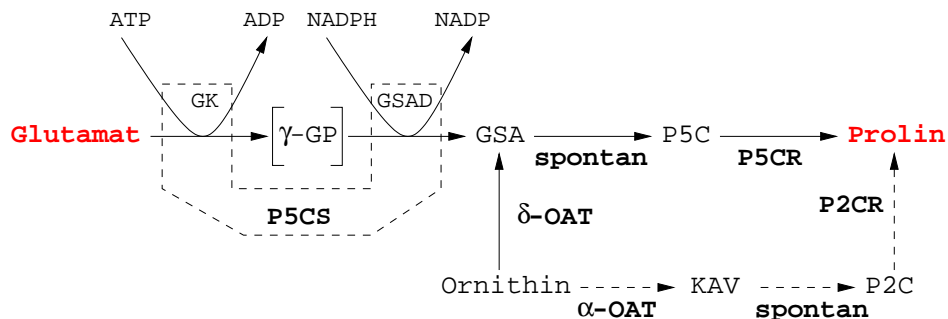


Abbildung 1.3: Die Biosynthese von Prolin. Gezeigt sind beide Synthesewege, ausgehend von Ornithin und Glutamat. Die gestrichelten Linien zeigen einen Weg an, dessen Enzyme in Pflanzen noch nicht gefunden wurden. **P5CS**: Pyrrolin-5-carboxylat-synthetase, **GK**:  $\gamma$ -Glutamatkinase,  **$\gamma$ -GP**:  $\gamma$ -Glutamatphosphat, **GSAD**: Glutamatsemialdehyd-dehydrogenase, **GSA**: Glutamatsemialdehyd, **P5C**: Pyrrolin-5-carboxylat, **P5CR**: Pyrrolin-5-carboxylat-reduktase,  **$\gamma$ -OAT**:  $\gamma$ -Ornithinaminotransferase,  **$\alpha$ -OAT**:  $\alpha$ -Ornithinaminotransferase, **KAV**:  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -aminovalerat, **P2C**: Pyrrolin-2-carboxylat, **P2CR**: Pyrrolin-2-carboxylat-reduktase.

Der zweite Weg umgeht die Reaktion der P5CS und startet beim Ornithin. Auch wenn von Mestichelli et al. [1979] gezeigt wurde, daß es in Pflanzen die  $\alpha$ -Ornithinaminotransferase gibt, so sind bis heute keine Sequenzen dafür entdeckt worden.

Der Weg über die  $\delta$ -**Ornithinaminotransferase** ( $\delta$ -OAT, 2.6.1.13) ist eine Alternative zum Glutamatweg. Das Enzym transaminiert die  $\delta$ -Aminogruppe von Ornithin. Es wurde bei Pflanzen aus *Vigna aconitifolia* [Delauney et al., 1993] und *Arabidopsis* [Roosens et al., 1998] kloniert, beide tragen ein mitochondriales Transitpeptid.

### Biosynthese von Arginin

Die Biosynthese von Arginin beginnt ebenfalls bei der Aminosäure Glutamat. Es wird durch fünf enzymatische Reaktionen in Ornithin umgewandelt, mit Hilfe von drei weiteren Enzyme entsteht daraus Arginin (siehe Abbildung 1.4). Die Aktivität der letzten drei Enzyme ist schon in den 70er Jahren in Pflanzen nachgewiesen worden [Bonner and Varner, 1976]. Nur für wenige der insgesamt neun Enzyme gibt es durch Experimente bestätigte Proteinsequenzen.

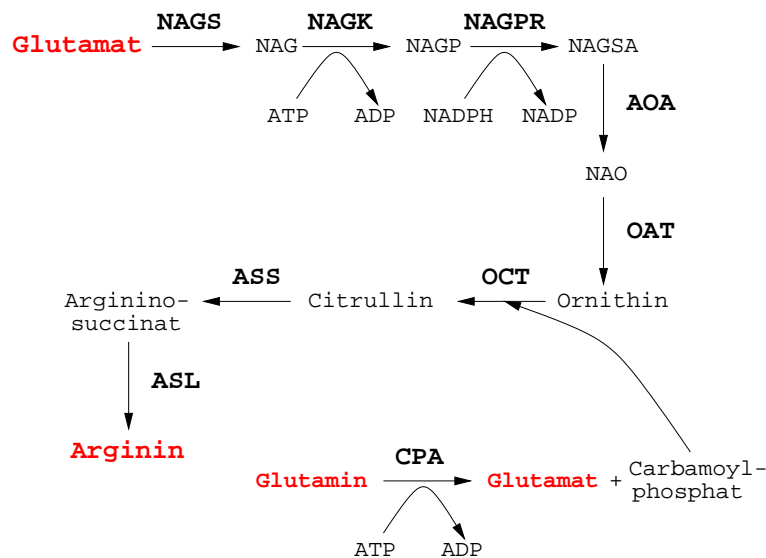


Abbildung 1.4: Die Biosynthese von Arginin. **NAGS**: N-Acetylglutamatsynthetase, **NAG**: N-Acetylglutamat, **NAGK**: N-Acetylglutamatkinase, **NAGP**: N-Acetylglutamatphosphat, **NAGPR**: N-Acetylglutamatphosphatreduktase, **NAGSA**: N-Acetylglutamatsemialdehyd, **AOA**: Acetylornithin-aminotransferase, **NAO**: N-Acetylornithin, **OAT**: Ornithin-acetyltransferase, **CPA**: Carbamoylphosphatsynthetase, **OCT**: Ornithin-carbamoyltransferase, **ASS**: Argininosuccinatsynthetase, **ASL**: Argininosuccinatlyase.

Zu Beginn der Synthese katalysiert die **N-Acetylglutamatsynthetase** (NAGS, 2.3.1.1) die Acetylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutamats. Diese Enzymaktivität wurde von Morris and Thompson[1975] in *Chlorella vulgaris* und in *Beta vulgaris* biochemisch nachgewiesen [Morris and Thompson, 1977]. Molekulare Analysen von diesem Enzym gibt es in Pflanzen noch nicht.

Die  $\delta$ -Carboxygruppe des N-Acetylglutamats wird von der **N-Acetylglutamatkinase** (NAGK, 2.7.2.8) unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Denes [1970] charakterisierte das Enzym in *Chlamydomonas reinhardtii* und McKay and Shar-

gool[1981] in *Pisum sativum*. Das codierende Gen *argB* wurde im Plastidengenom der Rotalge *Porphyra umbilicalis* gefunden [Reith and Munholland, 1993].

Phosphoryliertes N-Acetylglutamat wird dann durch die **N-Acetylglutamat-phosphatreduktase** (NAGPR, 1.2.1.38) zum Semialdehyd reduziert. Als Reduktionsäquivalent verwendet das Enzym NADPH [Thompson, 1980]

Die **Acetylornithin-Aminotransferase** (AOA, 2.6.1.11) sorgt durch eine Transaminierung mit Glutamat für die Umwandlung der Aldehydgruppe in eine Aminogruppe. Es entsteht N-Acetylornithin [Thompson, 1980].

Die Abspaltung des Acetylrestes, katalysiert durch die **Ornithinacetyltransferase** (OAT, 2.3.1.35), führt zu Ornithin. Jain and Sharggol [1984] reinigten aus *Pisum sativum* die OAT und die NAGS auf.

Die **Carbamoylphosphatsynthetase** (CPSase, 6.3.5.5, früher 2.7.2.9) hydrolysiert unter ATP-Verbrauch Glutamin. Als Produkt entsteht Glutamat und Carbamoylphosphat, welches dann für die OCT (siehe unten) zur Verfügung steht. Die CPSase stellt sowohl für den Pyrimidin- als auch für den Argininstoffwechsel Carbamoylphosphat bereit. In höheren Eukaryoten und Eubakterien gibt es für diesen Zweck zwei verschiedene Isoenzyme, eines für Arginin und eines für Pyrimidin [van den Hoff et al., 1995]. In Pflanzen hingegen wurde nur ein Enzym gefunden, das in beiden Stoffwechselwegen aktiv ist. Die Aktivität dieser CPSase wurde im Plastiden gezeigt [Shibata et al., 1986]. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten und wurde aus *Medicago sativa* kloniert [Zhou et al., 2000]. In dieser Pflanze liegen die beiden Untereinheiten aufgrund einer Fusion auf einem Gen. Diese Genfusion findet man auch bei nichtphotosynthetischen Eukaryoten. Aus *Arabidopsis* ist bis jetzt nur die kleine Untereinheit charakterisiert worden, die große Untereinheit wird von einem anderen Gen codiert [Brandenburg et al., 1998]. Auch in Eubakterien liegen die Untereinheiten getrennt auf zwei Genen vor [van den Hoff et al., 1995].

Die **Ornithincarbamoyltransferase** (OCT, 2.1.3.3) wandelt Ornithin zu Citrullin um. Dabei stammt die Aminogruppe aus Aspartat. Das Enzym wurde in mehreren Pflanzen biochemisch charakterisiert [Baker and Yon, 1983, de Ruiter and Kollöffel, 1985, Slocum et al., 1990]. Williamson et al. [1996] isolierten das Gen für die OCT aus *Pisum sativum*, welches ein plastidäres Transitpeptid besitzt. Das gilt auch für das Gen aus *Arabidopsis* [Quesada et al., 1999].

Citrullin wird dann von der **Argininosuccinatsynthetase** (ASS, 6.3.4.5) zu Argininosuccinat umgewandelt. Shargool [1971] wies diese Aktivität in Pflanzen zum ersten Mal in *Pisum sativum* nach.

Als letztes katalysiert die **Argininosuccinatlase** (ASL, 4.3.2.1) die Umwandlung in Arginin. Ihre Aktivität konnte in mehreren Beispielen bei Pflanzen gezeigt

## Biosynthese von Histidin

Die Biosynthese von Histidin gehört nur indirekt zur Glutamatfamilie. Während bei den oben genannten Aminosäuren die Synthese mit der Umwandlung von Glutamat startet, geht hier Glutamat in die Synthese von Histidin nur als Lieferant von Stickstoffatomen ein. Das Grundgerüst des Histidins stammt aus Ribose-5-phosphat [Alifano et al., 1996, Fujimori and Ohta, 1998b]. Die Histidinsynthese besteht aus 11 enzymatischen Schritten und wird in Eubakterien von 8 Enzymen codiert, die auf einem Operon liegen. In Pflanzen scheint die Histidinsynthese ähnlich abzulaufen. Pro Histidinmolekül werden 41 Moleküle ATP benötigt [Ohta et al., 2000]. Einige der Enzyme in der Histidinbiosynthese sind multifunktionell, auch wenn die Genomorganisation kein Operon ist [Alifano et al., 1996]. Sie sind zu einem Polypeptid fusioniert, welches die Enzymaktivität von mehr als einem Enzym zeigt.

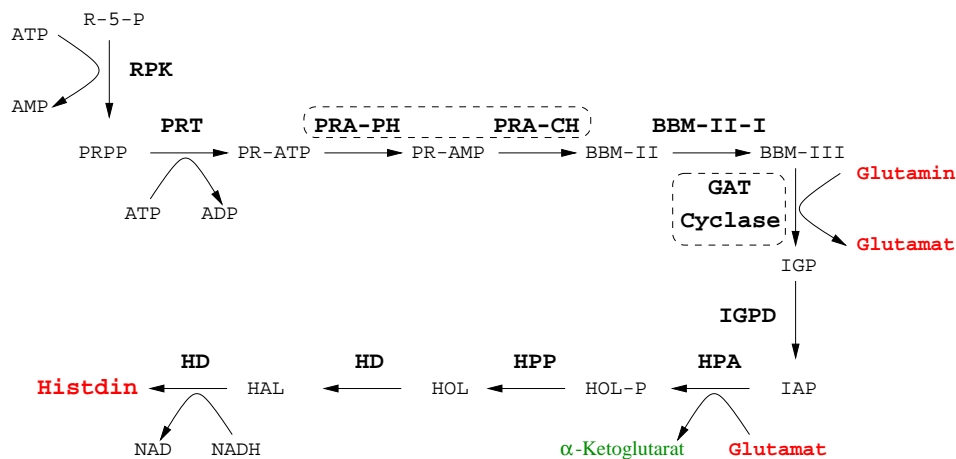


Abbildung 1.5: Die Biosynthese von Histidin. Die Enzyme PRA-PH und PRA-CH liegen in Pflanzen in einem bifunktionellem Enzym vor. **R-5-P**: Ribose-5-phosphat, **RPK**: Ribose-pyrophosphokinase, **PRPP**: Phosphoribosylpyrophosphat, **PRT**: Phosphoribosyltransferase, **PR-ATP**: Phosphoribosyl-ATP, **PRA-PH**: Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase, **PR-AMP**: Phosphoribosyl-AMP, **PRA-CH**: Phosphoribosyl-ATP-cyclohydrolase, **BBM-II**: N'-[(5-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid, **BBM-II-I**: BBM-II-Isomerase **BBM-III**: N'-[(5-phosphoribulosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid, **GAT**: Glutaminamin, **IGP**: Imidazolglyceratphosphat, **IGPD**: Imidazolglyceratphosphat-Dehydratase, **IAP**: Imidazolacetolphosphat **HPA**: Histidinolphosphataminotransferase, **HOL-P**: Histidinolphosphat, **HPP**: Histidinolphosphatphosphatase, **HOL**: Histidinol, **HD**: Histidinoldehydrogenase, **HAL**: Histidinal



Das 5-Phosphoribosylpyrophosphat entsteht durch Phosphorylierung von Ribose-5-phosphat. Dieser Schritt wird von der **Ribosepyrophosphokinase** (RPK, 2.7.6.1) katalysiert. Zwei sehr ähnliche Isoenzyme dieses Enzyms wurden in *Spinacia oleracea* gefunden, sie besitzen ein plastidäres Transitpeptid [Krath and Hove-Jensen, 1999].

Das nächste Enzym der Histidinsynthese ist die **ATP-Phosphoribosyltransferase** (PRT, 2.4.2.17), welches eine Kondensation von 5-Phosphoribosylpyrophosphat mit ATP herbeiführt. Aus *Arabidopsis* sind zwei Isoformen isoliert worden: AtATP-PRT1 und AtATP-PRT2. Sie sind zu 74 % identisch und enthalten beide ein plastidäres Signalpeptid [Ohta et al., 2000].

Die folgenden beiden Enzyme, die den zweiten und dritten Schritt katalysieren, liegen als ein bifunktionelles Enzym in *Arabidopsis* vor. Die Aktivität der **Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase** (PRA-PH, 3.6.1.31) ist in der C-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert und hydrolysiert das PR-ATP zu PR-AMP. Der Purinring des PR-AMPs wird von der **Phosphoribosyl-AMP-Cyclohydrolase** (PRA-CH, 3.5.4.19) geöffnet, es entsteht BBM-II (siehe Abbildung 1.5) [Fujimori and Ohta, 1998b].

Das nächste Enzym der Histidinsynthese ist die **BBM-II-Isomerase** (BBM-II-I, 5.3.1.16). Es katalysiert eine interne Redoxreaktion, die durch eine Isomerisierung die Aminoaldolase BBM-II in die Aminoketose BBM-III umwandelt [Ali-fano et al., 1996]. Das aus *Arabidopsis* klonierte Gen trägt ein plastidäres Signalpeptid [Fujimori et al., 1998].

Die bifunktionelle **Imidazolglyceratphosphat-Synthase** aus *Arabidopsis* besitzt zwei enzymatische Aktivitäten. Am N-Terminus des Enzyms At-HF befindet sich eine **Glutaminamidotransferase** (GAT), am C-Terminus eine **Cyclase**. Das pflanzliche Gen trägt ein plastidäres Signalpeptid [Fujimori and Ohta, 1998a]. Die Gen für die GAT ist bei *Cyanophora paradoxa* und *Cyanidium caldarium* im Plastidengenom codiert. Die Funktion der GAT ist die Übertragung eines Stickstoffatoms auf BBM-III, die Cyclase spaltet die Seitenkette des BBM-III und es wird Imidazolglyceratphosphat frei.

Die **Imidazolglyceratphosphat-Dehydratase** (IGPD, 4.2.1.19) ist in Pflanzen ein monofunktionelles Enzym, das vermutlich auch in den Plastiden transportiert wird. In *Arabidopsis* hat man zwei Isoenzyme gefunden [Tada et al., 1994]. Es wandelt Imidolglyceratphosphat in Imidazolacetolphosphat um.

Als nächstes Enzym folgt die **Histidinolphosphat-Aminotransferase** (HPA, 2.6.1.9). Es überträgt die Aminogruppe von Glutamat auf Imidazolacetolphosphat. Dabei entsteht Histidinolphosphat. Das HPA-Gen aus Tabak trägt N-terminal ein plastidäres Transitpeptid [Malki et al., 1998, Malki and Jacobs, 2001].

Das vorletzte Enzym ist die **Histidinolphosphatphosphatase** (HPP, 3.1.3.15).

Sie wandelt das Histidinolphosphat in Histidinol um. Die Enzymaktivität liegt bei  $\gamma$ -Proteobakterien als bifunktionelles Enzym vor, zusammen mit IGPD (s.o.). In der Hefe ist das Enzym (HIS2) monofunktionell. Bis jetzt sind keine Sequenzen aus Pflanzen für dieses Enzym bekannt.

Als letztes wandelt die **Histidindehydrogenase** (HDH, 1.1.1.23) Histidinol in Histidin und danach in Histidin um. Die HDH katalysiert die Vier-Elektronen-Oxidation des Aminoalkohol Histidinol zur Säure Histidin durch zwei aufeinanderfolgende Reduktionen des NAD zu NADH. Das Enzym wurde aus *Brassica oleracea* [Nagai et al., 1991] und *Thlaspi goesingense* [Persans et al., 1999] kloniert und biochemisch untersucht.

### 1.2.2 Die Aspartatfamilie

Zur Aspartatfamilie gehören folgende Aminosäuren: Aspartat, Asparagin, Threonin, Methionin, Isoleucin und Lysin (siehe Abbildung 1.6). Nach der Synthese von Aspartat aus Oxalacetat steht diese Aminosäure für die Synthese der anderen zur Verfügung.

#### Biosynthese von Aspartat und Asparagin

Die **Aspartat-Aminotransferase** (AspAT, 2.6.1.1) katalysiert die reversible Transaminierung von Oxalacetat und Glutamat (siehe Abbildung 1.7). Die Produkte sind Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat. Diese Reaktion ist essentiell für den Prozess der primären Stickstoffassimilation, da so wieder  $\alpha$ -Ketoglutarat für die Aufnahme von Ammonium zur Verfügung steht. Alle pflanzlichen Aspartatkinasen sind kernkodiert. In Pflanzen gibt es mindestens 3 Isoenzyme, die im Cytosol, Mitochondrien oder den Plastiden lokalisiert sind [Schultz and Coruzzi, 1995]. In *Arabidopsis* hat man eine Genfamilie von fünf Isoenzymen gefunden [Buchanan et al., 2000]. Das Gen ASP1 codiert für eine mitochondriale Aspartat-Aminotransferase, ASP2 und ASP4 für eine cytosolische Form und die Genprodukte von ASP3 und ASP5 werden in den Plastiden transportiert [Wilkie et al., 1995, Schultz and Coruzzi, 1995].

Die Glutamin-abhängige **Asparaginsynthetase** (AS 1, 6.3.5.4) katalysiert die Transaminierung von Glutamin und Aspartat zu Glutamat und Asparagin (siehe Abbildung 1.7). Sie wurde in Pflanzen unter anderem auch in *Arabidopsis* charakterisiert [Lam et al., 1994]. Es wird angenommen, daß es in Pflanzen auch die Ammonium-abhängige Asparaginsynthetase (6.3.1.1) gibt [Lam et al., 1996]. Allerdings sind weder Sequenzen dafür bekannt noch weiß man, ob die Glutamin-abhängigen Asparaginsynthetasen nicht auch Ammonium umsetzen können. Bis

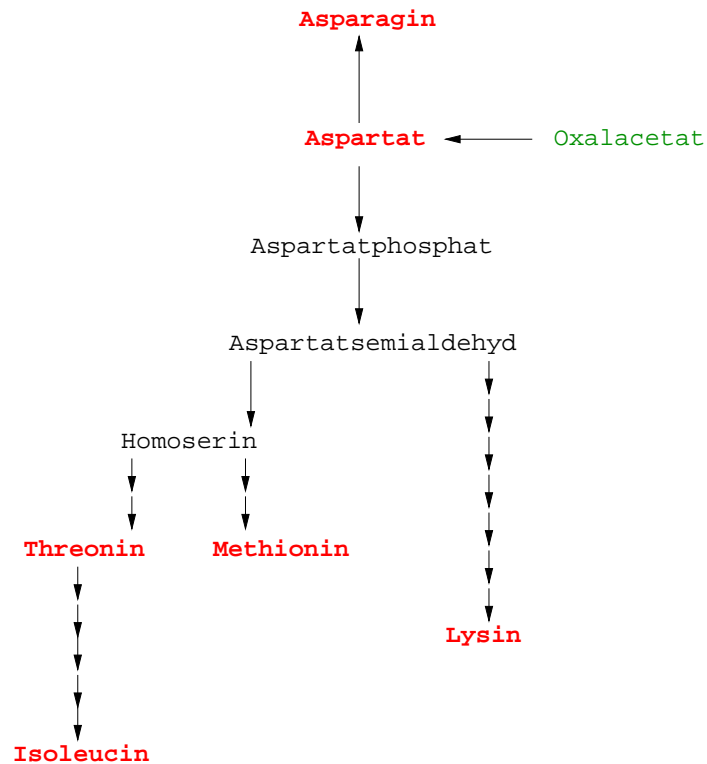


Abbildung 1.6: Schematischer Überblick über die Synthese der Aminosäuren ausgehend von Aspartat.

jetzt wurde nur in *Zea mays* diese Aktivität gezeigt [Lam et al., 1996]. Derartige bifunktionelle AS kennt man bei der menschlichen AS. In Eubakterien wie *E. coli* hingegen werden die Glutamin-abhängige und die Ammonium-abhängige von zwei verschiedenen Genen codiert [Buchanan et al., 2000]. Die **Asparaginase** (ASP, 3.5.1.1) katalysiert die Rückreaktion von Asparagin zu Aspartat. Dieses Enzym wurde in *Arabidopsis* [Casado et al., 1995] und in *Lupinus angustifolius* [Dickson et al., 1992] gefunden.

### Biosynthese von Threonin

Das Kohlenstoffgerüst der Aminosäure Threonin liefert Aspartat. Die Synthese beginnt mit einer Phosphorylierung des Aspartat zu Aspartatphosphat (siehe Abbildung 1.8), katalysiert von der **Aspartatkinase** (AK, 2.7.2.4). Die Aspartatkinase leitet nicht nur die Synthese von Threonin ein, sondern auch von Lysin und Methionin. Man unterscheidet die Aspartatkinasen in Abhängigkeit von ihrer

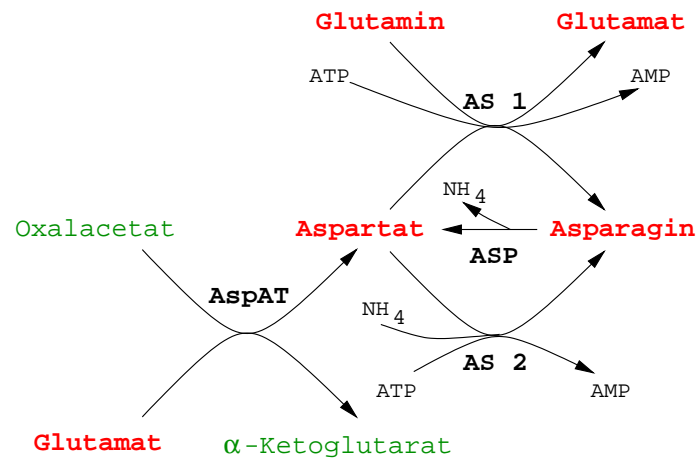


Abbildung 1.7: Synthese von Aspartat und Asparagin. **AspAT**: Aspartat-Aminotransferase, **AS 1**: Glutamin-abhängige Asparaginsynthetase, **AS 2**: Ammonium-abhängige Asparaginsynthetase, **ASP**: Asparaginase.

Regulation. Sie können durch Lysin oder Threonin feedback-reguliert sein [Azevedo and Lea, 2001]. Eine Lysin-sensitive Aspartatkinase wurde von Tang et al. [1997] aus *Arabidopsis* isoliert. Neben den monofunktionellen AKs gibt es auch bifunktionelle Enzyme, bestehend aus einer Aspartatkinase-Domäne (in *Arabidopsis* N-terminal) und einer Homoserindehydrogenase-Domäne (s.u.) [Gishlain et al., 1994]. Die Dehydrogenase wird für den dritten Schritt in der Threoninsynthese benötigt. Bifunktionelle AK/HDHs findet man auch bei Eubakterien, z.B. bei *E. coli* [Bender, 1985].

Die **Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase** (ASD, 1.2.1.11) katalysiert im nächsten Schritt die NADPH-abhängige Reduktion von Aspartatphosphat zu Aspartatsemialdehyd [Viola, 2001]. Sie ist in Pflanzen bis jetzt nur biochemisch untersucht worden [Azevedo et al., 1997], Proteinsequenzen gibt es noch nicht.

Anschließend katalysiert die **Homoserindehydrogenase** (HSD, 1.1.1.3) die NADPH-abhängige Reduktion von Aspartatsemialdehyd zu Homoserin. In Pflanzen gibt es ein bifunktionelles, threonin-sensitives Enzym aus AK und HDH mit plastidären Signalpeptid [Azevedo and Lea, 2001]. Dieses Enzym leitet die Synthese von Threonin und Methionin ein.

Das vierte Enzym in diesem Syntheseweg ist die **Homoserinkinase** (HSK, 2.7.1.39). Sie katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Homoserin zu Homoserinphosphat. [Viola, 2001] Bis jetzt wurde nur eine pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* isoliert [Lee and Leustek, 1999a]).

In einem letzten Schritt entsteht aus Homoserinphosphat Threonin. Die **Threoninsynthase** (THS, 4.2.99.2) katalysiert diese Reaktion. Pflanzliche Sequenzen sind aus *Arabidopsis* [Laber et al., 1999] und *Solanum tuberosum* bekannt. [Thomazeau et al., 2000] kristallisierte das Enzym aus *Arabidopsis*.

### Biosynthese von Methionin

Der Syntheseweg von Methionin ist nicht in allen Organismengruppen gleich. In Hefe wird Methionin durch die direkte Sulfhydrierung von O-Acetylhomoserin synthetisiert, in Eubakterien erfolgt die Synthese ausgehend vom Succinyl-Homoserin [Hesse et al., 2001]. Bei Mikroorganismen ist auch bereits das Homoserin das letzte gemeinsame Stoffwechselprodukt in der Synthese von Threonin und Methionin, bei Pflanzen trennen sich die Wege erst nach dem Phosphohomoserin [Datko et al., 1974].

In Pflanzen ist die **Cystathion- $\gamma$ -Synthase** (CGS, 4.2.99.9) das erste Enzym in der Methioninsynthese [Hesse et al., 2001] (siehe Abbildung 1.8). Es katalysiert die Transsulfurierung von Phosphohomoserin mit Cystein zu Cystathion [Ravanel et al., 1998]. Damit ist die Methioninsynthese eingeleitet. Das Enzym ist in Pflanzen (*Triticum aestivum*, Spinat) biochemisch untersucht worden [Kreft et al., 1994, Ravanel et al., 1995a]. Aus *Arabidopsis* [Kim and Leustek, 1996, Ravanel et al., 1998] und *Nicotiana tabacum* [Clausen et al., 1999] wurden die Gene kloniert.

Das C3-Gerüst des Cysteins wird danach durch die **Cystathion- $\beta$ -Lyase** (CBL, 4.4.1.8) gespalten und der Schwefel verbleibt am Homoserin. Es entsteht Homocystein, Pyruvat und Ammonium. In Spinat konnten eine plastidäre und eine cytosolische Isoform nachgewiesen werden [Droux et al., 1995, Hesse et al., 2001]. Die CBL aus *Arabidopsis* wurde sowohl aufgereinigt und biochemisch untersucht [Droux et al., 1995] als auch auf Sequenzebene charakterisiert [Ravanel et al., 1995b, Ravanel et al., 1996].

Der letzte Schritt der Methioninsynthese ist wahrscheinlich im Cytosol lokalisiert [Wallsgrove et al., 1983]. Die **Methioninsynthase** (MS, 2.1.1.14) wandelt durch eine Tetrahydrofolat-vermittelte Methylierung Homocystein zu Methionin. Pflanzen und Pilze haben eine Cobalmin-unabhängige MS, Eubakterien in der Regel eine Cobalmin-abhängige (2.1.1.13). In *E. coli* findet man Gene für beide Formen [Eckermann et al., 2000]. Die Methioninsynthase wurde aus *Catharanthus roseus* isoliert und charakterisiert [Eichel et al., 1995, Eckermann et al., 2000].

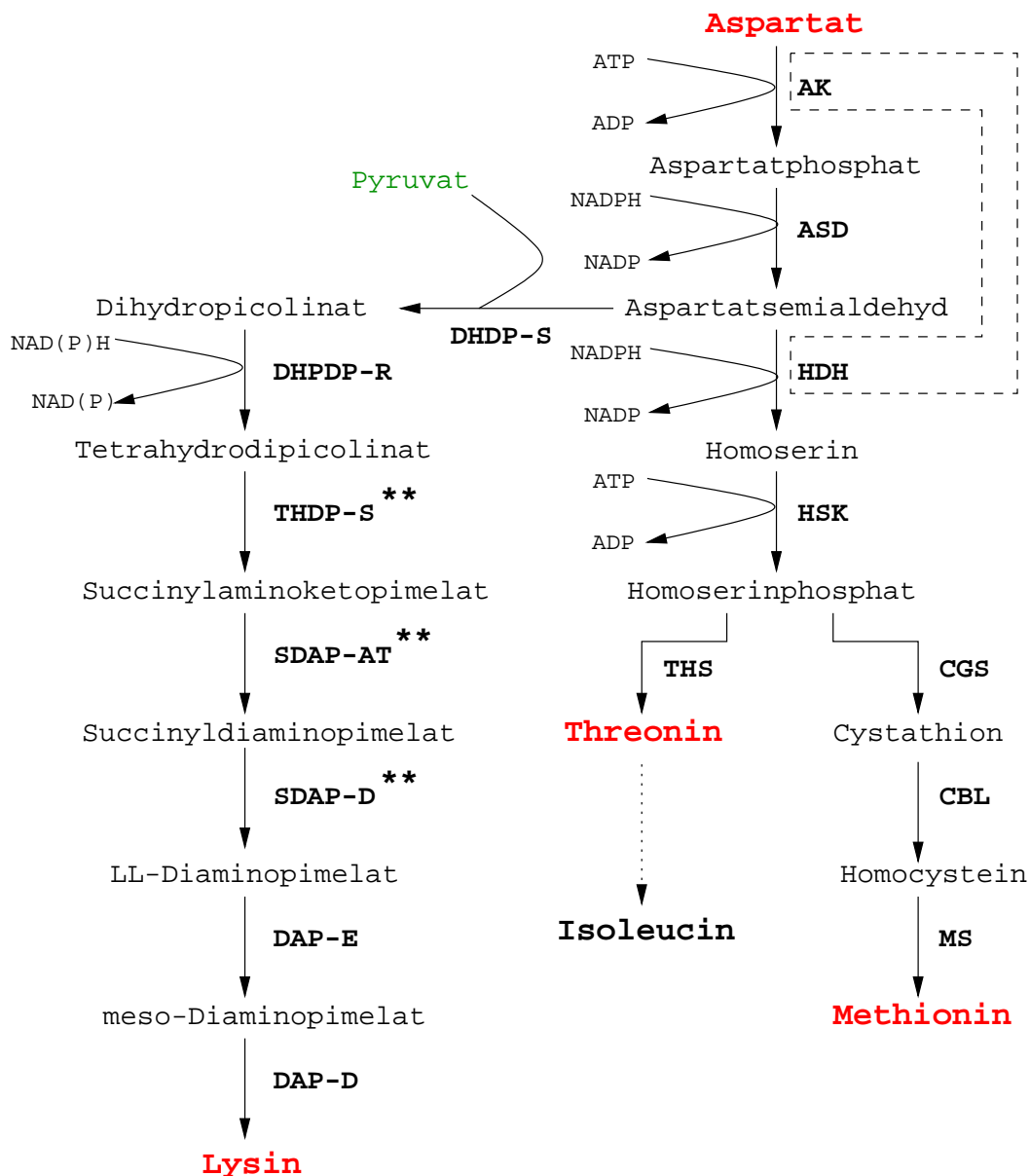


Abbildung 1.8: Synthese von Threonin, Methionin und Lysin aus Aspartat. Die Aspartatkinase existiert in einer monofunktionellen und einer bifunktionellen Form mit der Homoserindehydrogenase (siehe gestrichelte Linien). Die mit \*\* gekennzeichneten Enzyme wurden in Pflanzen noch nicht charakterisiert. **AK**: Aspartatkinase, **ASD**: Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, **HSD**: Homoserindehydrogenase, **HSK**: Homoserinkinase, **THS**: Threoninsynthase, **CGS**: Cystathion- $\gamma$ -Synthase, **CBL**: Cystathion- $\beta$ -Lyase, **MS**: Methioninsynthase, **DHDP-S**: Dihydrodipicolinatsynthase, **DHPDP-R**: Dihydrodipicolinat-reduktase, **THDP-S**: Tetrahydrodipicolinat-Succinylase, **SDAP-AT**: Succinyldiaminopimelat-Aminotransferase, **SDAP-D**: Succinyldiaminopimelat-Desuccinylase, **DAP-E**: Diaminopimelat-Epimerase, **DAP-D**: Diaminopimelat-Decarboxylase

## Biosynthese von Lysin

Man unterscheidet zwei verschiedenen Stoffwechselwege für die Synthese von Lysin. Der  $\alpha$ -Aminoadipat-Weg ( $\alpha$ -AA) wird von echten Pilzen und von thermophilen, gram-negativen Eubakterien benutzt [Nishida et al., 1999]. Den  $\alpha$ ,  $\beta$ -Diaminopimelat-Weg (DAP-Weg) hingegen findet man in allen höheren Pflanzen, Algen, Eubakterien und Oomyceten [Vauterin et al., 1999]. Insgesamt sind es sieben Enzyme, die Synthese von Lysin ausgehend vom Aspartatsemialdehyd katalysieren. In Pflanzen sind davon bis jetzt nur vier charakterisiert worden. Sie alle besitzen ein plastidäres Signalpeptid (siehe Abbildung 1.8).

Den ersten Schritt katalysiert die **Dihydrodipicolinatsynthase** (DHDP-S, 4.2.1.52). Sie vermittelt die Kondensation von Pyruvat und Aspartatsemialdehyd zu Dihydrodipicolinat und wurde schon aus Mais, Weizen, Spinat und Tabak charakterisiert [Azevedo et al., 1997]. In *Arabidopsis* wurden zwei Lysin-sensitive Isoenzyme gefunden [Vauterin and Jacobs, 1994, Vauterin et al., 1999, Sarrobert et al., 2000]

Als nächstes Enzym folgt die **Dihydrodipicolinatreduktase** (DHDP-R, 1.3.1.26). Ihre Aktivität, die Reduktion des Dihydrodipicolinats zu Tetrahydrodipicolinat, wurde in Soja, Tabak und Mais nachgewiesen [Chatterjee et al., 1994]. Die Sequenz aus *Arabidopsis* wurde nur anhand von Sequenzvergleichen identifiziert.

Für das Vorhandensein der nächsten drei Enzyme, die in *E. coli* charakterisiert worden sind, fehlt in Pflanzen noch der Nachweis. Die **Tetrahydrodipicolinat-Succinylase** (THDP-S, 2.3.1.117) überträgt Succinyl auf Tetrahydrodipicolinat, es entsteht Succinylaminoketopimelat, welches von der **Succinyldiaminopimelat-Aminotransferase** (SDAP-AT, 2.6.1.17) durch Transaminierung von Glutamat eine weitere Aminogruppe erhält. Das Succinyldiaminopimelat ist das Substrat der **Succinyldiaminopimelat-Desuccinylase** (SDAP-D, 3.5.1.18), die den Succinylrest abspaltet.

Die **Diaminopimelat-Epimerase** (DAP-E, 5.1.1.7) isomerisiert LL-Diaminopimelat zu *meso*-Diaminopimelat. Ihre Aktivität ist in Mais, Weizen, Soja und Tabak gezeigt worden [Chatterjee et al., 1994]. Die Sequenz aus *Arabidopsis* stammt aus dem Genomprojekt.

Im letzten Schritt der Biosynthese von Lysin wird von der **Diaminopimelat-Decarboxylase** (DAP-D, 4.1.1.20) eine Carboxygruppe von *meso*-Diaminopimelat abgespalten. Diese Aktivität wurde von Chatterjee et al. [1994] gezeigt. Das Enzym ist in den Plastiden lokalisiert [Mazelis et al., 1976]. Auch in diesem Fall wurde die einzige pflanzliche Sequenz im Genom von *Arabidopsis* entdeckt.

### Biosynthese von Isoleucin

Die Biosynthese von Isoleucin (siehe Abbildung 1.9) gehört zur Aspartatfamilie, da Threonin als Ausgangsprodukt dient. Der erste Schritt wird von der **Threonindehydratase** (THD, 4.2.1.16) eingeleitet. Es katalysiert die Deaminierung von Threonin zu  $\alpha$ -Oxobutyrat. Die Aktivität wurde in pflanzlichen Zellkulturen [Dougall, 1970] und in Spinat [Sharma and Mazumder, 1970] gezeigt. Sequenzen sind aus *Lycopersicon esculentum* [Samach et al., 1991], *Solanum tuberosum* [Hildmann et al., 1992] und *Arabidopsis* [Mourad et al., 1998] bekannt. Alle folgenden Enzyme sind substratspezifisch und arbeiten sowohl in der Isoleucin als auch in der Valinsynthese. Daher werden sie dort beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.3).

### 1.2.3 Die Pyruvatfamilie

Zur Pyruvatfamilie (siehe Abbildung 1.9) gehören die Aminosäuren Valin, Leucin und Alanin. Die Synthese von Leucin zweigt am vorletzten Schritt der Valinsynthese ab und führt nach vier weiteren Reaktionen zu Leucin. Alanin entsteht in einem einzigen Schritt aus Pyruvat. Oft werden die Stoffwechselwege von Isoleucin und Valin zusammen beschrieben, da sie sich alle Enzyme bis auf die Threonindehydratase teilen.

Die **Acetolactatsynthase** (ALS, 4.1.3.18) katalysiert den ersten Schritt in der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Das Enzym vermittelt die Kondensation von zwei Molekülen Pyruvat, um Acetolactat für die Synthese von Valin und Leucin zu bilden, oder die Kondensation von Pyruvat und 2-Oxobutyrat, um Acetohydroxybutyrat für die Synthese von Isoleucin zu bilden [Azevedo et al., 1997]. Die ALS ist das Ziel von vier verschiedenen Herbizidklassen: Sulphonylharnstoffe, Imidazolinone, Triazolopyrimidinsulfonamide und Pyrimidylxybenzoate [Schloss et al., 1988, Mourad and King, 1992]. In Hefe und anderen Pilzen findet man die ALS in den Mitochondrien [Chang and Duggleby, 1997], die pflanzlichen Enzyme sind im Plastiden lokalisiert [Hattori et al., 1995]. Pflanzliche Sequenzen sind unter anderen aus *Xanthium sp.* [Bernasconi et al., 1995], *Gossypium hirsutum* [Grula et al., 1995] und *Arabidopsis* isoliert worden [Sathasivan et al., 1990, Chang and Duggleby, 1997]. Die aktive ALS besteht aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen und einer regulatorischen. Beide sind in der Hefe charakterisiert worden [Pang and Duggleby, 1999]. Auch in Pflanzen wurden inzwischen die regulatorische Untereinheit in *Nicotiana* [Hershey et al., 1999] und *Arabidopsis* [Lee and Duggleby, 2001] gefunden.

Das nächste Enzym in der Isoleucinbiosynthese ist die **Acetohydroxyacidreduktoisomerase** (AHRI, 1.1.1.86), auch Ketolacidreduktoisomerase (KARI) ge-



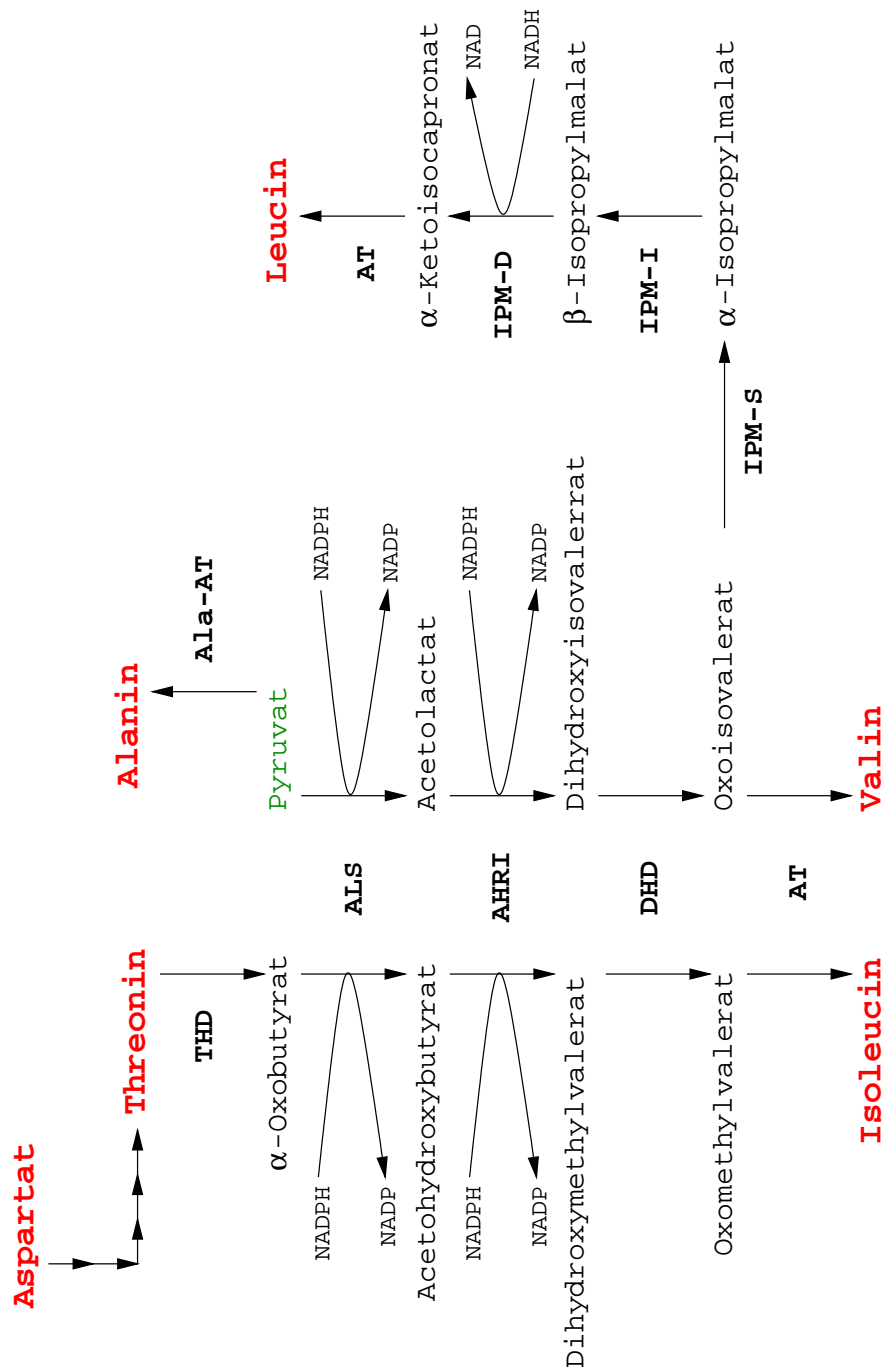


Abbildung 1.9: Synthese der Aminosäuren aus der Pyruvatfamilie (Leucin, Valin und Alanin) und von Isoleucin. **THD**: Threonindehydratase, **ALS**: Acetolactatsynthase, **AHRI**: Acetohydroxyacidreduktisomerase, **DHD**: Dihydroxyacid-Dehydratase, **AT**: Aminotransferase, **IPM-S**: Isopropylmalat-Synthase, **IPM-I**: Isopropylmalat-Isomerase, **IPM-D**: Isopropylmalat-Dehydrogenase, **Ala-AT**: Alanin-Aminotransferase

nannt. Es katalysiert eine ungewöhnliche Zwei-Schritt-Reaktion [Dumas et al., 2001]. In dieser Reaktion wird zuerst ein Alkylrest im Substrat (Acetolactat oder Acetohydroxybutyrat) verschoben. Danach wird das Molekül an der entstandenen Ketogruppe reduziert. Die Aktivität der AHRI wurde in den Plastiden aus Spinat gezeigt [Dumas et al., 1989]. Sequenzen sind aus Spinat [Dumas et al., 1991] und *Arabidopsis* [Curien et al., 1993] bekannt.

Das nächste Enzym der Isoleucinsynthese ist die **Dihydroxyacid-Dehydratase** (DHD, 4.2.1.9), es katalysiert den vierten Schritt der Synthese [Azevedo et al., 1997], in dem das Substrat dehydriert und eine Tautomerisierung durchgeführt wird. Es entsteht Oxomethylvalerat (Isoleucinsynthese) bzw. Oxoisovalerat (Valinsynthese). Letzteres ist der Vorläufer von Leucin. Die DHD wurde aus Spinat aufgereinigt [Flint and Emptage, 1988]. Eine pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* stammt aus dem Genomprojekt.

Im letzten Syntheseschritt entstehen die beiden Aminosäuren Isoleucin und Valin durch eine Transaminierung. Die Aminogruppe liefert je ein Molekül Glutamat. Dazu wird die Aktivität einer **Aminotransferase** (AT, 2.6.1.42) benötigt, die auch am letzten Schritt der Leucinsynthese eine Rolle spielt. Daher wird diese Aminotransferase auch nach ihrem Auftreten in der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren benannt [Azevedo et al., 1997].

### Biosynthese von Leucin

Die Biosynthese von Leucin ist in Pflanzen noch nicht umfassend erforscht worden. Die ersten drei Reaktionen bis zu Entstehung von Oxoisovalerat (siehe Abbildung 1.9) gleichen der Valinsynthese. Daran schließen sich vier weitere Schritte an.

Das Oxoisovalerat wird von der **Isopropylmalat-Synthetase** (IPM-S, 4.1.3.12) in  $\alpha$ -Isopropylmalat umgewandelt. Hagelstein and Schultz [1993] wiesen die Aktivität der Synthase in den Plastiden von Spinat nach. Experimentell bestätigte Sequenzen liegen noch nicht vor.

Das  $\alpha$ -Isopropylmalat wird von der **Isopropylmalat-Isomerase** (IPM-I, 4.2.1.33) in  $\beta$ -Isopropylmalat isomerisiert. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten. Aus *Arabidopsis* ist die kleine Untereinheit im Genomprojekt annotiert worden, die große Untereinheit wurde durch eine Datenbankrecherche gefunden.

Der vorletzte Schritt wird von der **Isopropylmalat-Dehydrogenase** (IPM-D, 1.1.1.85) katalysiert. Dieses Enzym wurde aus Raps [Ellerström et al., 1992] und aus der Kartoffel [Jackson et al., 1993] kloniert.

Als letztes überträgt eine **Aminotransferase** (AT, 2.6.1.42) eine Aminogruppe auf das  $\alpha$ -Ketoisocapronat. Dabei handelt es sich um die gleiche AT wie in der

Isoleucin- und Valinsynthese.

### Biosynthese von Alanin

Alanin entsteht in nur einem Schritt durch Transaminierung von Pyruvat. Die **Alanin-Aminotransferase** (Ala-AT, 2.6.1.2) wurde als erstes aus *Panicum miliaceum* charakterisiert [Son and Sugiyama, 1992], später von Kikuchi et al. [1999] aus *Oryza sativa*.

## 1.2.4 Die Phosphoglyceratfamilie

Die Phosphoglyceratfamilie besteht aus drei Aminosäuren: Serin, Glycin und Cystein. Auch hier sind, ähnlich der Pyruvatfamilie, die Synthesewege miteinander verschachtelt. Cystein entsteht direkt aus der Aminosäure Serin, Glycin und Serin sind ineinander umwandelbar.

### Biosynthese von Serin und Glycin

Pflanzen besitzen zwei verschiedene Möglichkeiten, Serin zu synthetisieren. Zum einen gibt es den Glykolatweg während der Photorespiration, zum anderen den Phosphoglyceratweg in den Plastiden [Ho and Saito, 2001].

Der **Phosphoglyceratweg** (siehe Abbildung 1.10.1) wird auch als phosphorylierter Weg bezeichnet und besteht aus drei enzymatischen Reaktionen. Alle drei Enzyme sind in den Plastiden lokalisiert [Ho and Saito, 2001].

Die **Phosphoglycerat-Dehydrogenase** (PGDH, 1.1.1.95) ist das erste Enzym in diesem Weg. Es katalysiert die Oxidierung von Phosphoglycerat zu Phosphohydroxypyruvat und wurde in Pflanzen erstmals von Slaughter and Davis [1968] biochemisch untersucht. Die erste pflanzliche Sequenz stammt aus *Arabidopsis* [Ho et al., 1999b].

Im nächsten Schritt katalysiert die **Phosphoserin-Aminotransferase** (PSAT, 2.6.1.52) eine Transaminierung. Die Aminogruppe von Glutamat wird auf Phosphohydroxypyruvat übertragen. Es entsteht Phosphoserin. Die PSAT wurde erstmals von Cheung et al. [1968] in Pflanzen nachgewiesen. Aus *Arabidopsis* wurde das Enzym von Ho et al. [1998] kloniert.

Die Dephosphorylierung des Phosphoserins zu Serin übernimmt die **Phosphoserin-Phosphatase** (PSP, 3.1.3.3). Auch von diesem Enzym stammt die erste pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* [Ho et al., 1999a].

Der **Glykolatweg** (siehe Abbildung 1.10.2) ist mit der Photosynthese und der Photorespiration verbunden und der häufigste Syntheseweg von Serin in photosynthetischen Geweben [Ho and Saito, 2001]. Glykolat entsteht während der Photorespiration in den Plastiden und wird in die Peroxisomen transportiert. Dort wird

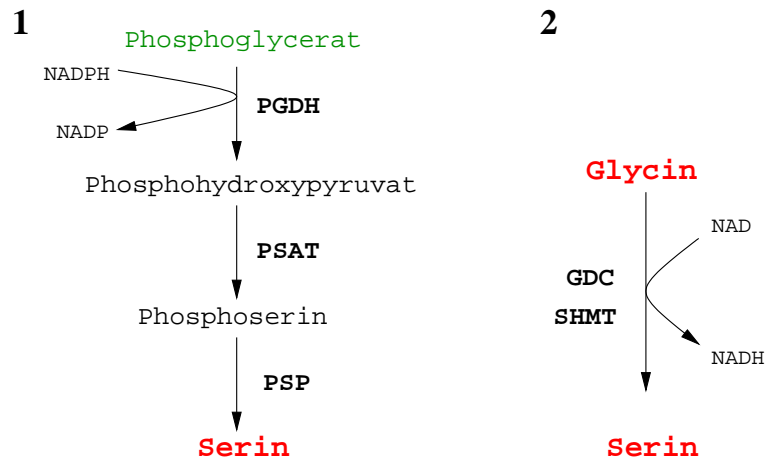


Abbildung 1.10: Synthese der Aminosäuren Serin und Glycin. Gezeigt sind (1) der Phosphoglyceratweg im Plastiden und der Glykolatweg (2) aus der Photorespiration im Mitochondrium. **PGDH**: Phosphoglycerat-Dehydrogenase, **PSAT**: Phosphoserin-Aminotransferase, **PSP**: Phosphoserin-Phosphatase, **GDC**: Glycin-Decarboxylase, **SHMT**: Serinhydroxymethyltransferase

es erst zu Glyoxylat umgewandelt, dann zu Glycin. Das Glycin wechselt zur Decarboxylierung und Deaminierung ins Mitochondrium. Das Ergebnis der letzten beiden Reaktionen ist Serin. Verantwortlich dafür sind die Glycin-Decarboxylase und die Serinhydroxymethyltransferase.

Die **Glycin-Decarboxylase** (GDC) ist ein Matrix-Enzym [Douce et al., 2001], das aus vier Polypeptiden besteht: P-Protein (Glycin-Dehydrogenase), H-Protein, T-Protein (Aminomethyltransferase) und L-Protein (Lipoamid-Dehydrogenase). Das P-Protein spaltet Glycin zu  $\text{CO}_2$  und Methylamin. Das Liponsäureamid des H-Protein übernimmt das Methylamin und überträgt es auf das T-Protein. Dabei bindet das Methylen-C-Atom an die Tetrahydrofolsäure des T-Proteins. Von der entstandenen N,N-Methylen-tetrahydrofolsäure übernimmt die Serinhydroxymethyltransferase den  $\text{C}_1$ -Körper und bindet ihn an Glycin. Auf diese Weise entstehen aus zwei Molekülen Glycin aus einem Molekül Serin. Die Reoxidation des Dihydroliponsäureamids katalysiert schließlich die L-Untereinheit der Glycin-Decarboxylase [Richter, 1998]. Die **Lipoamid-Dehydrogenase** (L-Protein, 1.8.1.4) ist nicht nur ein Bestandteil der Glycin-Decarboxylase, sondern auch in dem Multienzym Pyruvat-Dehydrogenase (1.2.4.1) enthalten (E3 genannt) [Bourguignon et al., 1996, Neuburger et al., 2000]. In *Arabidopsis* wurde zwei Isoenzyme des L-Proteins mit mitochondrialem Signalpeptid gefunden [Lutziger and Oliver, 2001]. Alle Untereinheiten der GDC und die SHMT sind von Turner et al. [1993] in *Pisum sativum* untersucht worden. Srinivasan and Oliver [1995] klonierten das

H-Protein aus *Arabidopsis*. Das P-Protein (1.4.4.2) wurde aus Spinat von Turner et al. [1992] charakterisiert und das T-Protein von Kopriva and Bauwe [1994] aus *Solanum tuberosum*.

Die **Serinhydroxymethyltransferase** (SHMT, 2.1.2.1) ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten, die die reversible Konversion von Serin und Tetrahydrofolat (THF) zu Glycin und Methylen-THF katalysieren. In *Arabidopsis* hat man zwei mitochondriale und drei cytosolische SHMTs gefunden [McClung et al., 2000]. Die Aminosäuren Glycin und Serin sind ineinander überführbar. Entweder entsteht Serin bei der Photorespiration aus zwei Molekülen Glycin oder die cytosolische SHMT wandelt Serin in Glycin um [Mouillon et al., 1999].

### Biosynthese von Cystein

Die Cysteinbiosynthese läuft in Pflanzen in zwei Schritten ab (siehe Abbildung 1.11), die die Verbindung zwischen dem Schwefel- und dem Stickstoffmetabolismus herstellen. Bei der Sulfasassimilation entsteht Schwefelwasserstoff, der in Form von Cystein fixiert wird.

Für die Fixierung wird zunächst Serin mit AcetylCoA aktiviert, es entsteht O-Acetylserin (OAS), katalysiert durch die **Serinacetyltransferase** (SAT, 2.3.1.30). Die Fixierung des Schwefelwasserstoffs katalysiert die **O-Acetylserin-(thiol)-Lyase** (OAS-TL, 4.2.99.8).

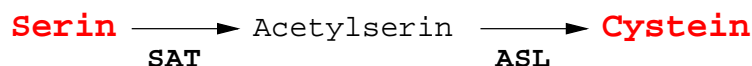


Abbildung 1.11: Synthese der Aminosäure Cystein aus Serin. **SAT**: Serinacetyltransferase, **ASL**: O-Acetylserin-(thiol)-Lyase

In Pflanzen findet man eine Reihe von cytosolischen, plastidären und mitochondrialen Isoformen von SAT und OAS-TL. Zusammen bilden sie den Cystein-synthase-Komplex [Wirtz et al., 2001]. In *Arabidopsis* hat man drei Isoformen der OAS-TL gefunden [Jost et al., 2000, Hesse and Altmann, 1995]. Auch von der SAT sind in *Arabidopsis* mehrere Isoformen isoliert worden [Ruffet et al., 1995, Bogdanova et al., 1995, Roberts and Wray, 1996, Howarth et al., 1997]

### 1.2.5 Die Phosphoenolpyruvatfamilie

Zur Phosphoenolpyruvatfamilie gehören alle aromatischen Aminosäuren: Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Sie werden in einem gemeinsamen Stoffwech-

selweg synthetisiert (siehe Abbildung 1.12). Chorismat ist der Vorläufer von allen dreien und entsteht in dem **Shikimatweg**, der nur in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommt [Macheroux et al., 1999].

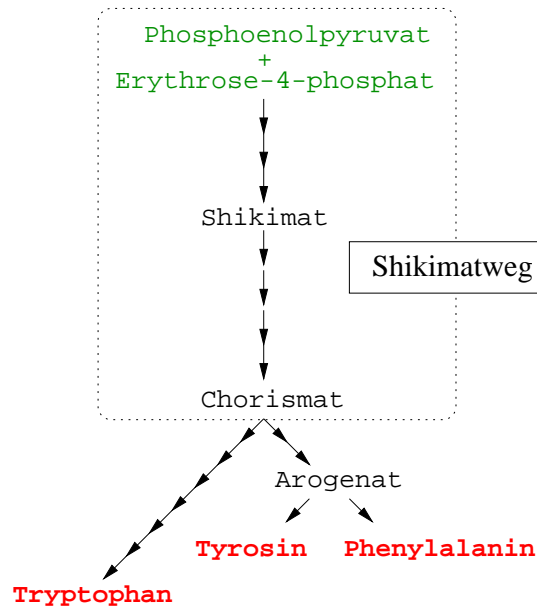


Abbildung 1.12: Überblick über den Syntheseweg der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan

Die Synthese von Chorismat besteht aus 7 Schritten (siehe Abbildung 1.13) und beginnt mit der Kondensation von zwei Intermediaten des Kohlenstoffmetabolismus: Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glycolyse und Erythrose-4-phosphat aus dem Pentosephosphatweg [Buchanan et al., 2000]. Die Reaktion katalysiert die **3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase** (DAHP-Synthase, 4.1.2.15). Das Enzym wurde in Pflanzen in *Daucus carota* [Suzich et al., 1985] und *Solanum tuberosum* [Pinto et al., 1986] biochemisch untersucht. Aus *Arabidopsis* sind die Sequenzen von drei Isoenzymen bekannt [Keith et al., 1991, Herrmann and Weaver, 1999] und aus *Lycopersicum esculentum* von zweien [Görlach et al., 1993].

Im zweiten Schritt wird DHAP von der **Dehydroquinat-Synthase** (DHS, 4.6.1.3) zu Dehydroquinat dephosphoryliert. Bischoff et al. [1996] klonierte die erste DHS aus höheren Pflanzen (*Lycopersicum esculentum*). In Pilzen ist dieses Enzym Bestandteil des pentafunktionellen AROM-Komplexes (4.6.1.3, 4.2.1.10, 1.1.1.25, 2.7.1.71, 2.5.1.19) [Herrmann and Weaver, 1999].

Die folgenden beiden Reaktionen werden in Pflanzen von einem bifunktionellen Enzym durchgeführt. Die Shikimat:NADP-Oxidoreductase enthält die **Dehy-**

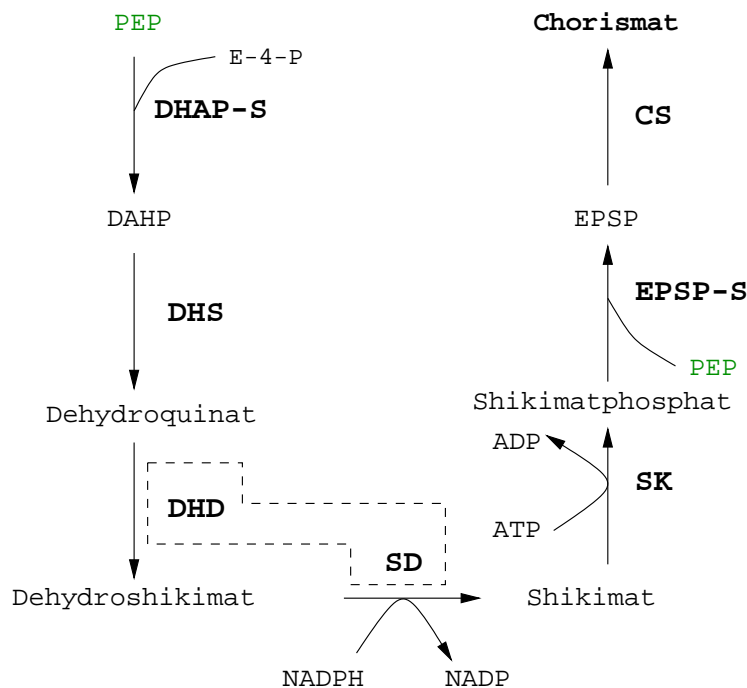


Abbildung 1.13: Die Synthese von Chorismat, dem gemeinsamen Vorläufer aller aromatischen Aminosäuren. Die bifunktionelle Shikimat:NADP-Oxidoreduktase enthält die Enzyme innerhalb der gestrichelten Linien. **PEP**: Phosphoenolpyruvat, **E-4-P**: Erythrose-4-phosphat, **DAHP-S**: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate-Synthase, **DHS**: Dehydroquinat-Synthase, **DHD**: Dehydroquinat-Dehydratase, **SD**: Shikimat-Dehydrogenase, **SK**: Shikimatkinase, **EPSP-S**: EPSP-Synthase, **CS**: Chorismatsynthase

**Dehydroquinat-Dehydratase** (DHD, 4.2.1.10) am N-Terminus und die **Shikimat-Dehydrogenase** (SD, 1.1.1.25) am C-Terminus. Beide Enzyme zusammen reduzieren Dehydroquinat über Dehydroshikimat zu Shikimat [Herrmann and Weaver, 1999]. Sie wurden bereits aus *Nicotiana tabacum* [Bonner and Jensen, 1994] und aus *Lycopersicon esculentum* [Bischoff et al., 2001] charakterisiert.

Im fünften Schritt phosphoryliert die **Shikimatkinase** (SK, 2.7.1.71) Shikimat an der 3-Hydroxylgruppe zu Shikimatphosphat. Die erste pflanzliche SK wurde von Schmid et al. [1992] aus *Lycopersicon esculentum* kloniert.

Das wohl bekannteste Enzym des Shikimatweges ist die **5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase** (EPSP-Synthase, 2.5.1.19). Es ist das Target des erfolgreichen Herbizids Glyphosat [Steinrücken and Amrhein, 1980, Ye et al., 2001]. An dieser Stelle geht ein weiteres Molekül Phosphoenolpyruvat in den Shikimatweg ein. Das Enzym ist in Pflanzen gründlich untersucht worden. Sequenzen gibt

es unter anderem aus *Arabidopsis* [Klee et al., 1987] und *Brassica napus* [Gasser and Klee, 1990].

Das letzte Enzym der Chorismatsynthese ist die **Chorismatsynthase** (CS, 4.6.1.4). Sie katalysiert die 1,4-Transeliminierung des Phosphats vom EPSP, es entsteht Chorismat [Macheroux et al., 1999]. Bis jetzt sind in *Lycopersium esculentum* zwei Isoformen der CS gefunden worden [Goerlach et al., 1993].

### Biosynthese von Tryptophan

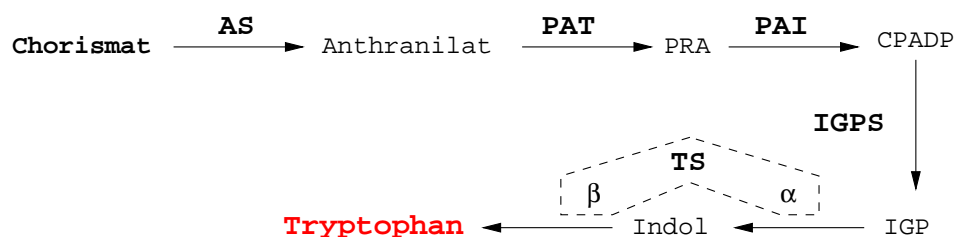


Abbildung 1.14: Die Synthese von Tryptophan aus Chorismat. **AS**: Anthranilatsynthase, **PAT**: Phosphoribosylanthranilattransferase, **PRA**: Phosphoribosylanthranilat, **PAI**: Phosphoribosylanthranilatisomerase, **CPADP**: 1-(O-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphat, **IGPS**: Indolglyceratphosphat-Synthase, **IGP**: Indolglyceratphosphat, **TS**: Tryptophan-Synthase mit zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$

Der Stoffwechselweg von Chorismat zu Tryptophan ist sehr wichtig für Pflanzen, weil ausgehend von diesem Weg viele sekundäre Metabolite synthetisiert werden. Alle Enzyme dieses Stoffwechsels sind in *Arabidopsis* im Plastiden nachgewiesen worden [Zhao and Last, 1995]. Der erste Schritt wird von der **Anthranilatsynthase** (AS, 4.1.3.27) katalysiert, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) besteht. Die  $\alpha$ -Untereinheit (Komponente I) katalysiert die Aminierung von Chorismat und entfernt Enolpyruvat. Dabei arbeitet sie eng zusammen mit der Glutaminaminotransferase-Aktivität der  $\beta$ -Untereinheit (Komponente II). So wie in Mikroorganismen kann auch die pflanzliche  $\alpha$ -Untereinheit allein aktiv sein, wenn genügend Ammonium zur Verfügung steht [Buchanan et al., 2000]. In *Arabidopsis* [Niyogi and Fink, 1992], *Ruta graveolens* [Bohlmann et al., 1995] und *Oryza sativa* [Tozawa et al., 2001] sind mehrere Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit gefunden worden. Die  $\beta$ -Untereinheit ist bei der Alge *Cyanophora paradoxa* im Plastiden codiert, in *Arabidopsis* gibt es zwei kerncodierte Gene [Niyogi et al., 1993].

Im nächsten Schritt wird Anthranilat von der **Phosphoribosylanthranilat-Transferase** (PAT, 2.4.2.18) zu Phosphoribosylanthranilat phosphoryliert. Dieses



wird anschließend durch die **Phosphoribosylanthranilat-Isomerase** (PAI, 5.3.1.24) in 1-(O-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat (CPADP) umgewandelt. Von der PAT ist in *Arabidopsis* nur ein Gen isoliert worden [Rose et al., 1992], für die PAI hingegen gibt es drei [Li et al., 1995].

Im vorletzten Schritt wird das CPADP decarboxyliert und zyklisiert. Es entsteht Indolglyceratphosphat. Die **Indolglyceratphosphat-Synthase** (IGPS, 4.1.1.48) wurde von Li et al. [1995b] aus *Arabidopsis* isoliert. Biochemische Untersuchungen zu diesem Enzym gibt es bis jetzt noch nicht [Buchanan et al., 2000].

Die **Tryptophan-Synthase** (TS, 4.2.1.20) besteht wie die AS aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$ -Untereinheit. Beide zusammen katalysieren die letzten Schritte der Tryptophansynthese. Die  $\alpha$ -Untereinheit setzt Indolglyceratphosphat zu Indol um, die  $\beta$ -Untereinheit katalysiert die Kondensation von Indol und Serin zu Tryptophan. Die Untereinheiten sind nur dann aktiv, wenn sie in einem Komplex vorliegen [Ro and Miles, 1999]. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist bei den Rotalgen *Porphyra purpurea* und *Cyanidium caldarium* im Plastidengenom codiert. In *Arabidopsis* hat man je zwei Gene für die  $\alpha$ -Untereinheit [Radwanski et al., 1995] und die  $\beta$ -Untereinheit [Berlin et al., 1989, Pruitt and Last, 1993] charakterisieren können.

### Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin

In Prokaryoten und Pflanzen werden Tyrosin und Phenylalanin aus Chorismat über Prephenat synthetisiert (siehe Abbildung 1.15). Welcher Weg für diese Biosynthese in Pflanzen eingeschlagen wird, ist noch nicht endgültig geklärt worden. Zum einen gibt es den allgemein bekannten **Arogenatweg**, der sowohl zu Tyrosin als auch zu Phenylalanin führt. Hinweise zu diesem Syntheseweg kamen von [Jung et al., 1986]. Ein alternativer Weg führt über **Prephenat** als gemeinsamen Vorläufer zu den beiden Aminosäuren.

Die Synthese von Phenylalanin und Tyrosin wird bei beiden Wegen von der **Chorismatmutase** (CM, 5.4.99.5) eingeleitet. Das Enzym katalysiert die intramolekulare Umwandlung des Enolpyruvatrestes am Chorismat. Die Aktivität einer monofunktionellen CM wurde in Pflanzen (*Sorghum bicolor*, [Singh et al., 1985]), in Hefe [Schmidheini et al., 1989, Schnappauf et al., 1998] und in Archaeobakterien (*Methanococcus jannaschii*, [MacBeath et al., 1998]) gezeigt. Aus *Arabidopsis* wurden drei verschiedene Isoenzyme charakterisiert, von denen zwei plastidär sind und eines cytosolisch [Eberhard et al., 1996, Mobley et al., 1999].

Die **Prephenat-Aminotransferase** (P-AT) wandelt das Prephenat durch eine Transaminierung in Arogenat (= Pretyrosin) um, die direkte Vorstufe von Phenyl-

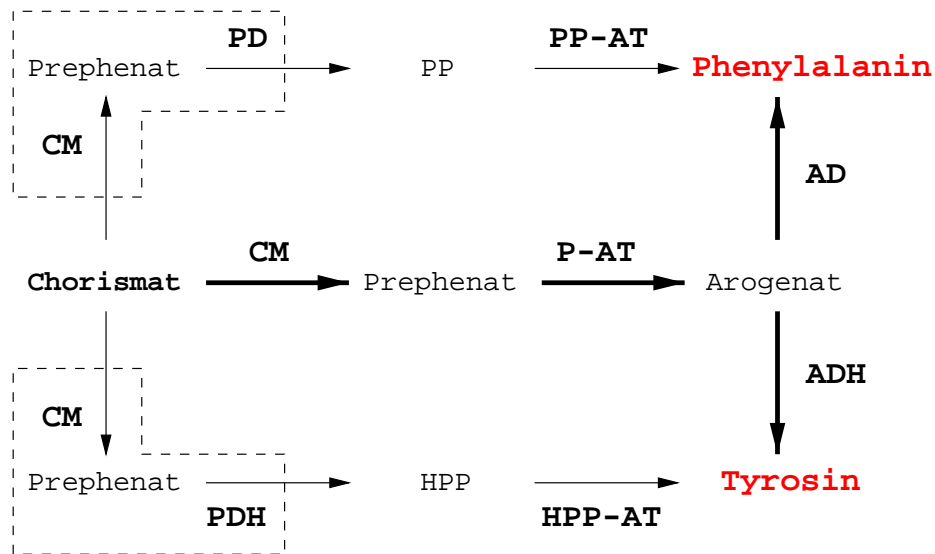


Abbildung 1.15: Die Synthese von Tyrosin und Phenylalanin. Der Hauptweg der Synthese geht über Arogenat als direkten Vorläufer der beiden Aminosäuren (fettgedruckte Pfeile). Ein alternativer Weg ist über Prephenat möglich. **CM**: Chorismatmutase, **PDH**: Prephenatdehydrogenase, **HPP**: Hydroxyphenylpyruvat, **HPP-AT**: Hydroxyphenylpyruvat-Aminotransferase, **P-AT**: Prephenat-Aminotransferase, **ADH**: Arogenatdehydrogenase, **AD**: Arogenatdehydratase, **PD**: Prephenatdehydratase, **PP**: Phenylpyruvat, **PP-AT**: Phenylpyruvat-Aminotransferase (verändert nach [Seigler, 1998])

alanin und Tyrosin [Bonner and Jensen, 1987b]. Die Aktivität der P-AT wurde in *Nicotiana glauca* [Bonner and Jensen, 1985] und in *Sorghum bicolor* [Siehl et al., 1986] gezeigt. Bisher gibt es keine Gensequenzen aus Pflanzen.

Das Arogenat wird entweder von der **Arogenatdehydratase** (AD, EC 4.2.1.91) zu Phenylalanin umgewandelt [Fischer and Jensen, 1987] oder von der **Arogenatdehydrogenase** (ADH, 1.3.1.43) zu Tyrosin [Bonner and Jensen, 1987a]. Sowohl die AD [Siehl and Conn, 1988] als auch die ADH [Connelly and Conn, 1986] sind in *Sorghum bicolor* biochemisch charakterisiert worden. Auch von diesen Enzymen fehlen bisher Sequenzdaten.

Es gibt in Pflanzen Hinweise auf den alternativen Weg zur Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin, da auch Phenylpyruvat und Hydroxyphenylpyruvat als Zwischenprodukte gezeigt wurden [Seigler, 1998]. Diesen Weg bezeichnet man als **Prephenatweg**, da hier nicht Arogenat sondern Prephenat der letzte gemeinsame Vorläufer in der Synthese ist. Wahrscheinlich ist hier nicht die monofunktionelle Chorismatmutase das erste Enzym, sondern eine bifunktionelle Form (siehe Abbildung 1.15). Die bifunktionelle **Chorismatmutase/Prephenatdehydratase**

(CM, 5.4.99.5/PD, 4.2.1.51), ist in *E. coli* als P-Protein bekannt [Zhang et al., 1998] und wandelt Chorismat in Phenylpyruvat um. Aus diesem wird durch Transaminierung mit Hilfe der **Phenylpyruvat-Aminotransferase** (PP-AT, 2.6.1.58, Phenylalanin-Aminotransferase) Phenylalanin synthetisiert. Für die Synthese von Tyrosin gibt es eine zweite bifunktionelle **Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase** (CM, 5.4.99.5/PDH, 1.3.1.12). Sie wird in *E.coli* und anderen Enterobakterien T-Protein genannt [Ahmad and Jensen, 1987 & 1988] und reduziert Chorismat zu Hydroxyphenylpyruvat. Daraus entsteht durch einen weiteren enzymatischen Schritt Tyrosin, katalysiert von der **Hydroxyphenylpyruvat-Aminotransferase** (HPP-AT, 2.6.1.5), auch Tyrosin-Aminotransferase genannt. Sowohl die bifunktionelle CM/PD als auch die CM/PDH sind im Rahmen des Genomprojektes in *Arabidopsis* entdeckt worden. Die Tyrosin-Aminotransferase wurde von Lopukhina et al. [2001] aus *Arabidopsis* kloniert.

## 1.3 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich in zwei Punkte gliedern:

### Entwicklung von HTS-Assays für die Herbizidforschung

Erstens soll für ausgewählte Targets aus der pflanzlichen Aminosäuresynthese ein HTS-System etabliert werden. Zu den Enzymen gehören die N-Acetylglutamatkinase aus der Argininbiosynthese, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase aus der Threoninsynthese und die Threonindehydratase aus der Isoleucinsynthese. Alle vier Enzyme sollen aus *Arabidopsis thaliana* kloniert werden. Die Gene werden anschließend in ein prokaryotischen System gebracht, die Enzyme exprimiert und aufgereinigt. Für jedes der Enzyme wird ein enzymatisches Testsystem entwickelt, das für einen HTS-Assay optimiert werden muß.

### Automatisierte phylogenetische Analyse des Aminosäurestoffwechsels in Pflanzen

Zweitens ist das Ziel eine phylogenetische Analyse des pflanzlichen Aminosäurestoffwechsels anhand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. Dazu wird eine Datenbank mit allen bisher bekannten Enzymen aus *Arabidopsis* zusammengestellt, die an diesem Stoffwechselwegen beteiligt sind. Zum Vergleich werden alle bisher sequenzierten und verfügbaren eubakteriellen und archaeobakteriellen Genome herangezogen sowie die eukaryotischen Genome von *Homo sapiens*, *Caeno-*

*rhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Saccharomyces cerevisiae*. Hinzu kommen alle verfügbaren plastidären Genome und das mitochondriale Genom von *Reclinomonas americana*. Mit Hilfe von selbst entwickelten Perlprogrammen werden über eine Blastsuche Homologe in den Vergleichsgenomen identifiziert und automatisch ein multiplen Alignment mit diesen Sequenzen erstellt. Weitere Programme berechnen die phylogenetischen Bäume nach dem Maximum-Likelihood Prinzip und stellen diese anschließend graphisch dar. Das Ergebnis dieser Analyse soll einen Überblick über die Herkunft der pflanzlichen Enzyme in diesen Stoffwechselwegen geben.

## 2

# Material und Methoden

## 2.1 Geräte

Autoklav:	Westima-Sauter Sterilisator 4.4.6 S1
Dispergiersystem:	IKA-Ultra Turrax T25
Eismaschine:	Ziegra Eismaschine
Elektrophorese-Kammer:	Gibco-BRL
Folienschweißgerät:	Krups Vacupack 2 Plus
Geltrockner:	Biotec Fischer PH-t 40
Kühlwasserbad:	Julabo F 10-Kryostat
Kontaminationsmonitor:	Berthold LB 1210 B
Leuchttisch	Messinstrumentebau GmbH Erlangen
Magnetrührer:	Jahnke & Kunkel IKA-Combimag RET
Mikrowellengerät:	Siemens HF 1612
Mixer:	Waring Blendor
Netzgeräte	
für Agarose-Gele:	Ingenieurbüro Fischer
für Sequenzgele:	Pharmacia ECPS 3000/150
pH-Meter:	Schott CG 840
Pipetten:	Gilson 2, 20, 200, 1000
Schüttler:	Jahnke & Kunkel IKA-Vibrax-VXR
Schüttlerplattform:	GFL 3015
Sterilbank:	Heraeus Lamin Air HLB 2472
Szintilationszähler:	Packard TriCarb 1000
Transilluminator:	Bachhofer IL-350-M
Thermocycler:	Perkin Elmer DNA Thermal Cycler

Thermocycler:	Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 Eppendorf Mastercycler Gradient
UV-Handlampe:	Bachhofer HL-6-KL
Vakuum-Pumpe:	Edwards High Vacuum Pump mit Bachhofer Kühlfalle KF
Ultraschall:	Branson Sonifier B-12
Waagen:	Sartorius
Wasserbäder:	GFL
Vortexer:	Jahnke & Kunkel VF2
Zentrifugen	
Kühlzentrifugen:	Sorvall RC5B und Sorvall RC5C Rotoren: GSA, GS-3, SS-34, HB-4
Tischzentrifugen:	Heraeus Biofuge fresco, Biofuge22R, Biofuge 15
Ultrazentrifuge:	Beckmann L8-70M Rotor: 70.1 Ti, 60 Ti, SW 41
Untertischzentrifuge:	Beckmann GPKR Rotor: GH-3.7

## **2.2 Hard- und Software**

Hardware:	Digital DEC 3000 Intel PC
Software:	Wisconsin Package Programs GCG, Version 10 PHYLogeny Inference Package PHYLIP, Version 3.5c Clustalw Version 1.82 MOLPHY Version 2.3b3 Linux 2.0.33 XEmacs 20.4, te <sub>X</sub> 0.4 PERL Version 5.005_02 MySQL 3.22.21 GraFit Version 2.0, Erithacus Software

## **2.3 Chemikalien und Enzyme**

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol, Biozym, BioRad, BRL, Boehringer Mannheim, Fluka, Gibco  
BRL, Merck, Pharmacia, Riedel de Haen, Serva und Sigma.

Die Kulturmedien stammten von der Firma:

Gibco BRL.

Die Radiochemikalien lieferte die Firma:

Hartmann Analytics, Braunschweig.

Die verwendeten Enzyme lieferten folgende Firmen:

Stratagene, MBI Fermentas, Boehringer, Pharmacia, Merck, Biolabs, Serva, Perkin Elmer und Qiagen.

## 2.4 Lösungen und Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Kulturmedien nach Sambrook et al. [1989] und Asubel et al. [1999] hergestellt..

## 2.5 Pflanzenmaterial

Samen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia) wurden ausgesät und in einem Lichtschrank unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkel) bei 20 °C angezogen. Die benötigte Pflanzenerde bestand aus einer Mischung aus Floradur (Gardena), Sand und Vermiculite (Deutsche Vermiculite Dämmstoffe GmbH) im Verhältnis 2:1:1. Nach 6 Wochen wurden die Pflanzenblätter geerntet und bis zur Verarbeitung bei - 80 °C gelagert.

## 2.6 Vektoren und Stämme

### 2.6.1 Klonierungsvektoren

- Klonierung in Plasmide

Vektor: pBluescript SK (+) Phagemid (STRATAGENE®)  
[Short et al., 1988, Alting-Mees and Short, 1989]

*E. coli* Stamm: NM522  
recA<sup>+</sup> (supE, thi,  $\Delta$ (lac-proAB), hsd5,  
F', proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZ $\Delta$ M15

Vektor: pCR®-Blunt II TOPO (Invitrogen)  
*E. coli* Stamm: DH5 $\alpha$  (GibcoBRL)  
F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR*  
*recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>-</sup>) *phoA supE44* $\lambda$ <sup>-</sup>  
*thi-1 gyrA96 relA1*

- **Klonierung in Phagen**

Vektor: EcoRI predigested Lambda ZAP II (STRATAGENE®)  
*E. coli* Stämme: POP13  
 [Schwarz-Sommer et al., 1987]

SOLR<sup>TM</sup> (STRATAGENE)  
 e14–(*mcrA*)  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *sbcC recB*  
*recJ umuC::Tn5(kan<sup>r</sup>) uvrC lac gyrA96 relA1 thi-1*  
*endA1*  $\lambda^R$  [F' *proAB lacIqZ* $\Delta$ M15] Su<sup>–</sup>

XL1-Blue MRF' (STRATAGENE)  
 $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44*  
*thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ* $\Delta$ M15  
 Tn10(*tet<sup>r</sup>*)]

Helferphage: ExAssist helper phage (M13) (STRATAGENE)

## 2.6.2 Expressionsvektoren

- **Expression in Plasmiden**

Vektoren: pet28abc, pet32abc (Novagen)  
*E. coli* Stamm: BL21(DE3) (Novagen)  
 F<sup>–</sup> *dcm ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>–</sup>, m<sub>B</sub><sup>–</sup>) gal*(DE3)

## 2.7 Präparation von DNA

### 2.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Präparation von kompetenten Zellen mit Calciumchlorid und die Transformation (Hitzeschock) dieser Zellen wurde nach dem Protokoll von Cohen et al. [1972] durchgeführt.

### 2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte im analytischen Maßstab nach der Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook et al [1989] und mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Biorad).



Die Plasmid-Aufarbeitung im präparativen Maßstab wurde mit dem JETSTAR Plasmid Kit von Genomed und mit dem Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (Biorad) durchgeführt.

### **2.7.3 Differentielle DNA-Aufreinigung**

Bei der Aufarbeitung von DNA-Proben wird oft eine Abtrennung von Primern, Nukleotiden oder anderen DNA-Fragmenten verlangt. Für die Reinigung wurden folgenden Methoden angewandt:

#### **Ionenaustauscherchromatographie**

Die Schleudersäule Nucleo Spin Extract von Macherey und Nagel wird für die Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet. Das PCR-Produkt wird zusammen mit dem Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und zur Abtrennung von Primern und Nukleotiden zentrifugiert. Der Elutionspuffer bewirkt eine pH-Wert-Veränderung und führt so zur Elution der DNA. Die genaue Durchführung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

#### **Gelfiltration**

**Spun Columns** Die Spun columns von Pharmacia sind mit Sepharyl S-300, einem quervernetzten Dextran, als Gelmatrix gepackt. Sie erlauben eine Abtrennung von DNA-Molekülen bis zu einer Länge von 118 bp. Sie werden nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

**QIAEX II und QIAquick** Das Aufreinigung von Nukleinsäuren mit den QIAEX- und QIAquick-Säulen von Qiagen arbeiten nach dem Prinzip der Gelfiltration. Die Säulen wurden nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

## **2.8 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Für eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration ist ein Vergleich mit dem Größenmarker im Agarose-Gel ausreichend, vor allem, wenn nur sehr wenig DNA zur Verfügung steht. Eine genaue Konzentrationsbestimmung wird jedoch photometrisch vorgenommen. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer Basen ultraviolette Licht zwischen 250 nm und 270 nm Wellenlänge. Das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm [Sambrook et al., 1989].

Die Konzentrationsbestimmung wird in dem Biophotometer (Eppendorf) bei 260 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von 50 µg/ml (gilt für doppelsträngige DNA).

## 2.9 Isolierung von mRNA aus Pflanzen

20-40 g tiefgefrorenes Pflanzenmaterial werden in einem vorgekühltem Mörser vorsichtig unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff etwa 30 Minuten lang zerkleinert. In eine 500 ml Schottflasche werden 4-5 g Polyklar und 200 ml Aufnahmebuffer (500 mM Tris HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 0,2 % SDS, 10 mM EDTA pH 8, 0,2 mg/ml Proteinase K, 30 mM β-Mercaptoethanol) vorgelegt und das zerkleinerte Pflanzenmaterial in die Flasche überführt. Die Flasche wird 5 Minuten gut geschüttelt und anschließend der Inhalt in einen Zentrifugenbecher gegeben. Nach einem kurzen Zentrifugieren bei 650 g im GSA-Rotor wird der Überstand in zwei frische Zentrifugenbecher pipettiert. Es wird ein Volumen PCIA (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1) dazugegeben und nach gutem Mischen für 5 Minuten bei 16300 g im GSA zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und ein weiteres Mal phenolisiert und zentrifugiert. Der Überstand mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 6,5 und 1 Vol Isopropanol für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Danach wird 30 Minuten in der Kälte zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Bindungspuffer (400 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 0,2 % SDS, 0,2 mg/ml Proteinase K) gelöst. Unlösliche Reste werden durch ein kurzes Zentrifugieren abgetrennt. Die so gewonnene Gesamt-RNA wird entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung der mRNA wird die Gesamt-RNA auf eine vorbereitete Oligo-Säule gegeben. Dazu werden 400-500 mg Oligo-Cellulose in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 25 ml Bindungspuffer überschichtet. Die Suspension wird gut vermischt und für eine Minute zentrifugiert (915 g). Der Überstand wird verworfen und dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt. Auf die so vorbereitete Oligo-Säule wird die Gesamt-RNA pipettiert und 1 h unter ständigem Mischen resuspendiert. Danach wird für eine Minute zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die an die Oligo-Cellulose gebundene mRNA wird dreimal mit 25 ml Bindungspuffer gewaschen und einmal mit 25 ml Waschpuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 0,4 % SDS, 0,2 mg/ml Proteinase K). Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und komplett in eine Drucksäule überführt. Die Oligo-Cellulose wird etwa 1 Stunde mit dem Waschpuffer gewaschen bis die Eluate eine konstante optische Dichte (OD<sub>260</sub>) erreicht haben. Dann wird zweimal mit 3 ml Elutionspuffer (100 mM Tris HCl

pH 7,5, 0,2 mg/ml Proteinase K) in ein Corex-Röhrchen eluiert. Die Fraktion wird mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 6,5 und 2 Vol Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wird für 45 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und das Pellet in 400 µl TE aufgenommen. Nach dem Lösen wird erneut mit Natriumacetat und Ethanol für zwei Stunden gefällt, nach dem Zentrifugieren mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet zu 1 µg/µl in TE gelöst. Die Aufbewahrung der mRNA erfolgt bei -80 °C .

### 2.9.1 Herstellung einer cDNA-Bank

Die cDNA-Synthese wird mit dem cDNA Synthesis Kit von Pharmacia nach dem Gubler-Hoffman-Verfahren [Gubler and Hoffman, 1983] durchgeführt. Dabei werden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Zur besseren Kontrolle der Syntheserate wird in den Ansatz für die Erststrang-Synthese 1 µl  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP (3000 Ci/mmol) pipettiert. An die Enden der cDNA werden EcoRI/NotI-Adaptoren ligiert, um die cDNA für die Ligation in den  $\lambda$ ZAP II Vektor vorzubereiten. Die Ligation und die Verpackung der Phagen mit dem Gigapack III Gold (Stratagene) erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers [Stratagene, 1997]. Die Phagen werden in POP13-Zellen vermehrt.

## 2.10 Nachweis von Rekombinanten durch die Filter-Hybridisierung

Zur gezielten Identifizierung rekombinanter Phagen werden die Plaques auf einen Filter übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert [Benton and Davis, 1977]. Die positiven Plaques werden zur Vereinzelung isoliert und noch ein zweites Mal plattiert und hybridisiert.

**Herstellung von Replikafiltern** Die NZ-Platten mit den rekombinanten Phagen werden vor dem Abziehen der Filter mindestens eine Stunde bei 4 °C gelagert. Auf die kalten Platten werden dann mit Handschuhen und mit Hilfe einer Briefmarkenpinzette die Nitrocellulose-Rundfilter (BiotTrace® NT Blotting Membran, Gelman) luftblasenfrei aufgelegt. Nach 15 min werden die Filter wieder abgezogen. Vorher jedoch markiert man die Position der Filter auf der Platte, indem man mehrmals mit einer Kanüle asymmetrisch durch den Filter in die Platte sticht und die Plattennummer mit einem Kopierstift auf dem Filterrand vermerkt. Die Filter werden dann für 10 min auf Whatman 3MM Filterpapier gelegt, das mit Southern I durchtränkt ist. Anschließend legt man sie für jeweils 10 min auf Whatman 3MM

Filterpapier mit Southern II und mit 2x SSPE. Die Plaque-Seite muß dabei immer oben liegen und darf nicht von den Lösungen überschwemmt werden. Anschließend wird die denaturierte DNA durch Backen bei 80 °C (45 min) an der Membran fixiert.

**Filter-Hybridisierung** Der Filter wird für eine Stunde im Wasserbad unter Schütteln bei der geeigneten Hybridisierungstemperatur in Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgegossen und durch Hybridisierungslösung ersetzt. Die denaturierte Sonde (siehe 2.10.1) wird direkt in das Gefäß hineinpipettiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht. Am nächsten Tag wird die Sonde in ein Falconröhrchen abgegossen und bei -20 °C aufbewahrt. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wird dadurch entfernt, daß der Filter dreimal nacheinander in der Waschlösung geschwenkt wird. Die Waschlösung wird bei diesem Vorgang immer wieder abgegossen. Dann wird der Filter zur Volumenerhöhung in eine große Schale gelegt und mit Waschlösung je nach Signalstärke zweimal für 30 min gewaschen. Dabei wird die Signalstärke mit einem Szintillationszähler kontrolliert. Der Filter wird anschließend zum Trocknen auf Whatman 3MM Filterpapier gelegt und dann auf ein frisches Whatmann 3MM geklebt. Um die Orientierung zu erleichtern, klebt man zusätzlich radioaktive Punkte asymmetrisch auf das Papier. Das Papier mit dem Filter wird mit Frischhaltefolie abgedeckt und mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie gelegt. Je nach Signalstärke wird mehrere Stunden oder über Nacht bei -80 °C exponiert.

<b>20x SSPE</b>	20 mM EDTA 3 M NaCl 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH-Wert 7,4 mit NaOH einstellen
<b>Southern I</b>	0,5 M NaOH 1,0 M NaCl
<b>Southern II</b>	3 M NaCl 0,5 M Tris pH-Wert 7,5 mit HCl einstellen
<b>Prähybridisierungslösung</b>	6x SSPE 0,1 % SDS (w/v) 0,02 % PVP (w/v) 0,02 % Ficoll 400 (w/v)
vor Gebrauch 50 µg/ml PolyA-DNA zugeben	

<b>Hybridisierungslösung</b>	3x SSPE
	0,1 % SDS (w/v)
vor Gebrauch 50 µg/ml	0,02 % PVP (w/v)
PolyA zugeben	0,02 % Ficoll 400 (w/v)
<b>Waschlösung</b>	2x SSPE
	0,1 % SDS
<b>SM-Puffer</b>	0,1 M NaCl
	0,01 M MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,05 M Tris HCl pH 7,5
	0,01 % Gelatinelösung

**Vereinzelung von positiven Phagen** Nach der Entwicklung wird der Röntgenfilm auf einen Leuchttisch gelegt und mit den aufgeklebten Rundfiltern zur Deckung gebracht. Die Loch-Markierung und die Nummer der Filter wird mit einem Folienstift auf den Film übertragen. Anschließend ordnet man den Signalen auf dem Film die NZ-Platte zu und sticht mit einer Pasteurpipette in den Plaque, der das Signal erzeugt hat. Der Plaque wird in 500 µl SM-Puffer mit 20 µl Chloroform überführt. Nachdem die Phagen in etwa zwei Stunden aus der Agarose diffundiert sind, wird eine 1:500 Verdünnung in SM-Puffer hergestellt. Von der Verdünnung pipettiert man jeweils 1 µl und 5 µl zu 20 µl POP13 Zellen und plattiert diese nach 30 min Adsorption mit Top-Agarose auf NZ-Platten. Am nächsten Tag werden auf die Platten Nitrocellulose-Filter gelegt und die Filter nach dem oben beschriebenen Protokoll ein zweites Mal mit der gleichen radioaktiven Sonde hybridisiert. Die Filter werden auf dem entwickelten Film den Signalen zugeordnet und die entsprechenden Plaques auf den Platten werden wieder mit einer Pasteurpipette ausgestochen. Die Phagen werden nach dem Protokoll für die *in vivo* Excision aufgearbeitet [Stratagene, 1997]. Dabei werden aus dem rekombinanten Phagen Plasmide mit der gesuchten Insertion ausgeschleust. Die Plasmide werden dann vermehrt und isoliert (siehe 2.7.2) und die Insertion anschließend sequenziert.

### 2.10.1 Radioaktive Markierung einer Oligosonde

Die Markierung der Oligosonden (40-mere) erfolgt über eine Endmarkierung mit  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP. Die Oligosonde wird auf 10 pmol/µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt und folgendes zusammenpipettiert:

<b>Markierung</b>	5 $\mu$ l 10x Kinasepuffer 1,7 $\mu$ l Oligosonde (10 pmol/ $\mu$ l) 33 $\mu$ l H <sub>2</sub> O 10 $\mu$ l $\gamma$ P <sup>32</sup> ATP (2 pmol/ $\mu$ l) 20 U T4-Kinase
<b>10x Kinasepuffer</b>	0,5 M Tris HCl pH 7,5 0.1 M MgCl <sub>2</sub> 50 mM DTT 1 mM Spermidin 1 mM EDTA pH 8,0

Der Ansatz zur Markierung wird 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und kann anschließend direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

## 2.11 Radioaktive Sequenzierung

Die Didesoxy-Sequenzierung nach dem Verfahren von Sanger et al. [1977] beruht auf einem Kettenabbruch, der beim Einbau eines Didesoxynukleotids während der Synthesereaktion der DNA-Polymerase erfolgt. Da aber gleichzeitig mit ddNTPs auch dNTP angeboten werden, kommt es statistisch gesehen nach jeder eingebauten Base zu einem Kettenabbruch. Trägt man das Produkt dieser Reaktion auf einen denaturierenden Polyacrylamidgel auf, so kann man die Sequenz der eingesetzten DNA ablesen.

<b>Annealing-Puffer</b>	280 mM Tris HCl pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 160 mM DTT
<b>Labelling-Mix</b>	1,3 $\mu$ M dCTP 1,3 $\mu$ M dGTP 1,3 $\mu$ M dTTP 335 mM NaCl
<b>Stop-Mix</b>	95 % Formamid (v/v) 20 mM EDTA pH 8,0 0,05 % Bromphenolblau (w/v) 0,05 % Xylencyanol FF (w/v)

	Terminationsmische			
	A-Term.	C-Term.	G-Term.	T-Term.
ddATP	6 $\mu$ M	-	-	-
ddCTP	-	6 $\mu$ M	-	-
ddGTP	-	-	8 $\mu$ M	-
ddTTP	-	-	-	8 $\mu$ M
dATP	160 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M
dCTP	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M
dGTP	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M
dTTP	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M	120 $\mu$ M
NaCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM

**Anlagerung des Primers** Es werden 8  $\mu$ l DNA (2  $\mu$ g) mit 2  $\mu$ l 2 M NaOH für 10 min denaturiert. Nach Zugabe von 3  $\mu$ l 3 M NaOAc pH 4,8, 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 60  $\mu$ l Ethanol wird gut gemischt und für 15 min auf Eis gefällt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 22.000 g und 8 °C. Der Überstand wird mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wird mit 500  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Hybridisierung werden 2  $\mu$ l des Primers (1 pmol/ $\mu$ l) und 2  $\mu$ l Annealing-Puffer hinzugegeben und 20 min bei 37 °C, danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

**Sequenzreaktion** Auf einer Mikrotiterplatte werden je 2,5  $\mu$ l der Terminationsmische vorgelegt. Dann werden zu den 14  $\mu$ l DNA aus der Hybridisierungsreaktion 3  $\mu$ l Labelling-Mix und 0,5  $\mu$ l [ $\alpha^{35}$ S] dATP (10  $\mu$ C/ $\mu$ l) pipettiert und gut gemischt. Dazu gibt man 2  $\mu$ l T<sub>7</sub> DNA-Polymerase (1 U/ $\mu$ l) und nach genau 5 min bei Raumtemperatur werden je 4,5  $\mu$ l in die vorgelegten Terminationsmische pipettiert und für weitere 5 min bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Dann wird die Synthese mit je 5  $\mu$ l Stop-Mix beendet. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wird der Ansatz bei 80 °C im Wasserbad denaturiert. Das Gel wird mit etwa 2  $\mu$ l Probe beladen.

Alternativ dazu wurde die Sequenzierung der Plasmid-DNA von dem Qiagen Sequencing Service (Qiagen, Hilden) mit einer garantierten Genauigkeit von >99,95 % durchgeführt.

Für die Sequenzierungen der Insertionen im pCR Blunt II TOPO sind die Primer M13-revers und M13-forward, für die pet-Vektoren die Primer T<sub>7</sub>-Promoter und T<sub>7</sub>-Terminator verwendet worden.

## 2.12 Subklonierung für die heterologe Expression

Die isolierten cDNAs der Targets werden zur Expression in einen Expressionsvektor subkloniert. Dazu wird der entsprechende Abschnitt über eine PCR [Saiki et al., 1988] amplifiziert.

Zur heterologen Expression der Gene wurden entsprechende Primer entworfen, die an den Enden Schnittstellen für den Expressionsvektor enthielten, um eine Klonierung in dem Leseraster zu gewährleisten. Zu diesem Zwecke wurden homologe Primer mit entsprechenden Schnittstellen für die Klonierung entworfen. Die PCR-Amplifikate wurden zunächst in den Vektor pCR Blunt II TOPO kloniert und mit den jeweiligen Restriktionsenzymen in einem quantitativen Ansatz (20 µg) herausgeschnitten, aufgereinigt und in den vorbereiteten pet-Vektor ligiert.

Zur Amplifizierung der Gene wurde folgender PCR-Ansatz pipettiert:

<b>PCR-Ansatz</b>	0,5 µl Pfx-Platinum (2,5 U/µl)
	1,5 µl dNTP (je 10 mM)
Σ 50 µl	1 µl MgSO <sub>4</sub> (50 mM)
	2 µl Primer forward (10 pmol/µl)
	2 µl Primer revers (10 pmol/µl)
	1 µl Plasmid-DNA (10 ng/µl)
	5 µl 10x PCR-Puffer
	13 µl H <sub>2</sub> O

Das jeweilige Gen wurde im Gradientencycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

**PCR-Programm** 5 min 95 °C

30 Zyklen: 30 s 95 °C  
 30 s Gradient ( $T_{min}$  50 °C bis  $T_{max}$  70 °C )  
 60 s 72 °C

10 min 72 °C

## 2.13 Aufarbeitung rekombinanter Proteine

Alle klonierten Gene wurden im pet-Expressionssystem exprimiert [Rosenberg et al., 1987, Studier et al., 1990]. In diesem System wird die Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die verwendeten Vektoren tragen an ihrem N-Terminus einen



sogenannten His-Tag. Das sind sechs aufeinanderfolgende Histidinreste, die N-terminal mit dem rekombinanten Protein fusioniert werden. Über diesen His-Tag ist die Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose möglich und auch die Detektion des Proteins in einem Western Blot mit einem Antikörper gegen den N-terminalen His-Tag.

### 2.13.1 Expression in *E. coli*

Zur Expression wird der Bakterienstamm BL21(DE3) mit dem entsprechenden pet-Vektor transformiert und kultiviert. Übernachtskulturen werden zu Glycerinkulturen verarbeitet [Sambrook et al., 1989] und bei -80 °C gelagert. Mit diesen Aliquots werden zwischen 5 ml und 250 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 1$  bei 37 °C auf dem Schüttler kultiviert. Danach werden die Kolben mit der Expressionskultur für 20 min bei 18 °C unter Schütteln abgekühlt. Anschließend wird die Expression mit 1 mM IPTG induziert und die Kolben bei dieser Temperatur über Nacht weitergeschüttelt. Am nächsten Tag werden die Kulturen pelletiert (20 min bei 8000 g) und das Pellet direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.13.2 Aufreinigung über Ni-NTA Agarose

Die Aufreinigung der Proteine erfolgt über die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie [Porath et al., 1975]. Dabei macht man sich den N-terminalen His-Tag der Proteine zunutze. Die Aufreinigung wird bei 4 °C durchgeführt.

Das Pellet einer Expressionskultur wird 25-fach konzentriert in Lysispuffer aufgenommen (z.B. Pellet einer 250 ml Kultur in 10 ml aufnehmen). Anschließend erfolgt im Ethanol/Eisbad ein Ultraschallaufschluß für je 40 s: einmal Stufe 4,5, zweimal Stufe 5, zweimal Stufe 5,5 und einmal Stufe 6. Zwischen den einzelnen Schritten liegen jeweils 30 s Pause. Die aufgeschlossenen Zellen werden bei 10.000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird zusammen mit Ni-NTA Agarose (Qiagen) in ein kleines Röhrchen überführt und bei 4 °C unter leichtem Schwenken mit der Ni-NTA Agarose für eine Stunde resuspendiert. Pro 1 ml Überstand werden 100  $\mu$ l Ni-NTA Agarose eingesetzt. Danach wird die Suspension in eine Poly Prep Chromatography Column (Biorad) überführt und der Durchfluß aufgefangen. Die Matrix mit dem gebundenen Protein wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen (zweimal 3 ml Waschpuffer für 1 ml Matrix) und das Protein in 4 Schritten mit Elutionspuffer (viermal 500  $\mu$ l bei 1 ml Matrix) von der Ni-NTA Agarose eluiert.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der Aufreinigungspuffer für die jeweiligen Enzyme aufgelistet. Lysis-, Wasch- und Elutionspuffer für

ein Enzym unterscheiden sich nur hinsichtlich der Imidazolkonzentration.

Enzym	Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
<b>NAGK</b>	100 mM Kaliumphosphat pH 7,5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Imidazol 400 mM KCl 10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 15 % Ethylenglykol	50 mM Imidazol	250 mM Imidazol
<b>HSK</b>	100 mM Hepes pH 7,8 KOH 5 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Imidazol 400 mM KCl 5mM $\beta$ -Mercaptoethanol 15 % Glycerin	50 mM Imidazol	250 mM Imidazol
<b>THD</b>	Tris HCl pH 9,0 20 mM Imidazol 400 mM KCl 5mM $\beta$ -Mercaptoethanol 20 % Glycerin	50 mM Imidazol	250 mM Imidazol

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wird mit dem Bradford-Reagenz bestimmt [Bradford, 1976].

### 2.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der aufgereinigten Proteine erfolgt in einem diskontinuierlichem Gelsystem [Laemmli, 1970]. Es wird das NuPAGE Electrophoresis System von Novex eingesetzt. Die Vorbereitung der Proben erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers mit dem LDS-Probenpuffer, verwendet werden 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele mit MOPS-Laufpuffer.

Die Proteingele werden mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt und fixiert [Ausubel et al., 1999].

### 2.13.4 Western-Blot

Zunächst werden die Proteine im Semi-Dry-Verfahren [Kyhse-Andersen, 1984] auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wird die XCell II-Blottingapparatur mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen und Materialien von Novex verwendet.

Anschließend wird die Detektion der rekombinanten Proteine nach den Anweisungen im QIAexpress Detection and Assay Handbook durchgeführt. Als Antikörper gegen den His-Tag wird ein Penta-His-Antikörper (Mouse IgG1, Qiagen) eingesetzt. An diesen ersten Antikörper bindet der zweite Antikörper, Anti-Mouse IgG (Sigma), an den die alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Zugegebene Substratlösung für die alkalische Phosphatase (BCIP/NBT Buffered Substrate, Sigma) erzeugt ein Signal auf der Membran. Als Positivkontrolle wird ein Marker mit auf das Proteingel geladen, dessen einzelne Proteine ebenfalls einen His-Tag tragen (6X His Protein Ladder, Qiagen).

## 2.14 Messung der Enzymaktivität

Zur Messung der Aktivität der heterolog exprimierten Enzyme wurden Aktivitätstests entwickelt, die alle in 384er Microtiterplatten (MTPs) mit einem Endvolumen von 100  $\mu$ l durchgeführt werden. Methoden, die auf der Absorption von Licht beruhen (Photometrie) werden mit dem Spectraluor Plus (Tecan) durchgeführt, Lumineszenzsignale (Luminometrie) werden mit der Lumibox (Eigenbau Bayer AG) gemessen.

### 2.14.1 N-Acetylglutamatkinase

Die N-Acetylglutamatkinase (NAGK) katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von N-Acetylglutamat zu N-Acetylglutamatphosphat. Der Assay wurde in Anlehnung an Denes [1970] und McKay and Shargool [1981] entwickelt und läuft in zwei Schritten ab. Zuerst katalysiert die NAGK die Umsetzung von N-Acetylglutamat. Das entstandene N-Acetylglutamatphosphat reagiert mit Hydroxylamin zu N-Acetylglutamat-5-hydroxylamat. Im zweiten Schritt wird das Hydroxylamat durch Zugabe von Eisen-III-chlorid quantifiziert, da es mit dreiwertigen Ionen einen roten Farbkomplex ausbildet, der photometrisch im Bereich von 480 nm bis 530 nm messbar ist. Das Eisen-III-chlorid erzeugt in diesem Wellenbereich kein Signal [Lipmann and Tuttle, 1945].

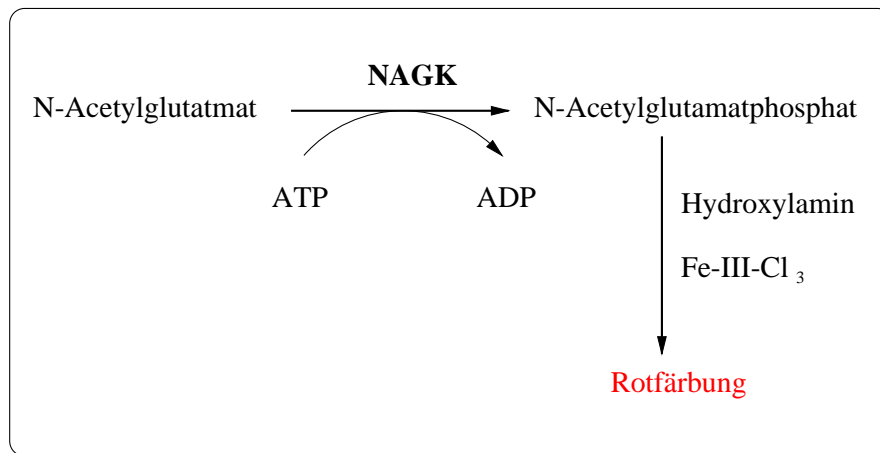


Abbildung 2.1: Photometrischer Assay zur Aktivitätsbestimmung der N-Acetylglutamatkinase (NAGK)

### Lösungen für den Enzymassay:

<b>MES-Puffer</b>	150 mM MES pH 6,0 NaOH 5 mM MgCl <sub>2</sub> 25 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 15 % Ethylenglykol
<b>N-Acetylglutamat</b>	200 mM N-Acetylglutamat in MES-Puffer
<b>ATP</b>	100 mM in H <sub>2</sub> O, neutralisiert mit NaOH
<b>Hydroxylamin</b>	4 M NH <sub>4</sub> OH im MES-Puffer pH 6,0 NaOH
<b>Stopplösung</b>	100 mM FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O in 1 M HCl
<b>BSA</b>	0,1 mg/ml in H <sub>2</sub> O

**Pipettierschema für 384er MTPs:**

	<b>Substrat-Mix</b>	<b>Enzym-Mix</b>	<b>Endkonz.</b>
N-Acetylglutamat	5 $\mu$ l		20 mM
ATP		5 $\mu$ l	10 mM
Hydroxylamin	5 $\mu$ l		400 mM
BSA		2 $\mu$ l	200 ng pro Kavität
Enzym(10 ng/ $\mu$ l)		5 $\mu$ l	50 ng pro Kavität
MES-Puffer	15 $\mu$ l	8 $\mu$ l	

Es werden 5  $\mu$ l Prüfsubstanz vorgelegt, Substrat- und Enzym-Mix dazupipettiert und der Assay für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 50  $\mu$ l Stoplösung hinzugegeben und die Extinktion bei 485 nm gemessen.

**2.14.2 Homoserinkinase**

Die Homoserinkinase katalysiert in der Threoninbiosynthese die Phosphorylierung von Homoserin zu Homoserinphosphat. Die Reaktion ist ATP-abhängig. Für dieses Enzym wurden zwei Assays etabliert.

**Gekoppelter Assay**

Der erste Assay ist ein gekoppelter Assay, der in drei Schritten abläuft. Zunächst wird Homoserin unter ATP-Verbrauch zu Homoserinphosphat umgesetzt. Das entstandene ADP wird von der Pyruvatkinase verwendet, um Phosphoenolpyruvat in Pyruvat umzuwandeln. Im zweiten Reaktionsschritt wird das Pyruvat durch Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin quantifiziert. Es entsteht dadurch ein Hydrazon, daß im alkalischen Milieu im dritten Schritt durch Zugabe von Kaliumhydroxid zu einer Rotfärbung führt. Die Determinierung von Ketosäuren mit Nitrophenylhydrazinen geht auf die Methode von Friedemann and Haugen [1943] zurück.

**Lösungen für den gekoppelten Enzymassay:**

<b>HMKG-Puffer</b>	100 mM Hepes pH 7,5 KOH 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 15 % Ethylenglykol
<b>Homoserin</b>	20 mM in H <sub>2</sub> O

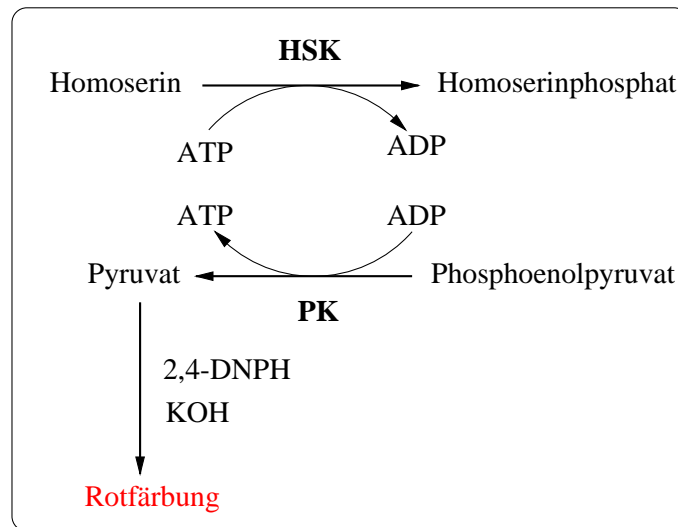


Abbildung 2.2: Gekoppelter Assay zur Aktivitätsbestimmung der Homoserinkinase. HSK: Homoserinkinase, PK: Pyruvatkinase, KOH: Kaliumhydroxid, 2,4-DNPH: 2,4-Dinitrophenylhydrazin

### Lösungen für den gekoppelten Enzymassay (Fortsetzung):

<b>ATP</b>	10 mM in H <sub>2</sub> O, neutralisiert mit NaOH
<b>Phosphoenolpyruvat</b>	10 mM in H <sub>2</sub> O
<b>Pyruvatkinase</b>	2 U/μl
<b>BSA</b>	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>2,4-DNPH</b>	0,1 % in 2 M HCl
<b>KOH</b>	2,5 M Kaliumhydroxid

**Pipettierschema für 384er MTPs:**

	<b>Reaktions-Ansatz</b>	<b>Endkonz.</b>
Homoserin	1,5 $\mu$ l	1 mM
ATP	9 $\mu$ l	3 mM
Phosphoenolpyruvat	6 $\mu$ l	2 mM
Pyruvatkinase	0,5 $\mu$ l	1 U pro Kavität
Enzym(50 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	100 ng pro Kavität
HMGK-Puffer	11 $\mu$ l	8 $\mu$ l

Der Reaktions-Ansatz wird zusammenpipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Dann folgt eine Zugabe von 12  $\mu$ l 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Nach weiteren 20 Minuten wird mit 55  $\mu$ l Kaliumhydroxid der Farbumschlag von gelb nach rot herbeigeführt, dessen maximale Extinktion bei 485 nm liegt.

**Lumineszenz-Assay**

Verfahren, bei denen die Intensität der Lichtemission zur Untersuchung von enzymkatalysierten Reaktionen dient, nennt man Biolumineszenz. Ein solches Verfahren stellt das Luciferin-Luciferase-System dar. Die Luciferase aus Leuchtkäfern katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 560 nm [DeLuca and McElroy, 1978, Lundovkikh et al., 2000]. Das emittierte Licht wird mit einem Luminometer gemessen.

Der zweite Assay wurde entwickelt, um einen generellen Assay für Kinasen zu etablieren. Der Lumineszenz-Assay ist ein negativer Assay, da es nur dann zu einem Signal kommt, wenn die Homoserinkinase gehemmt wird. Nur dann steht im zweiten Schritt der Luciferase noch ATP zur Verfügung, mit dem sie das Luciferin in Oxyluciferin unter Freisetzung eines Lumineszenzsignals umwandeln kann. In Abbildung 2.3 ist der Assay schematisch dargestellt.

**Lösungen für den Lumineszenzassay:**

<b>HMKG-Puffer</b>	100 mM Hepes pH 7,5 KOH 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 15 % Ethylenglykol
<b>Homoserin</b>	200 mM in H <sub>2</sub> O

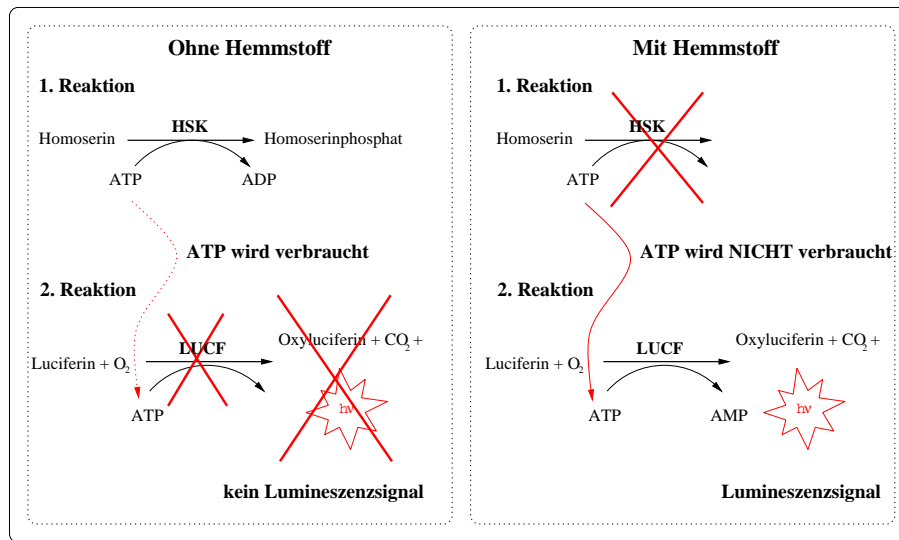


Abbildung 2.3: Lumineszenzassay zur Aktivitätsbestimmung der Homoserinkinase. Die Quantifizierung erfolgt über die abnehmende Lumineszenz bei aktiver Homoserinkinase, da dann das vorhandene ATP verbraucht wird und der Luciferase im zweiten Schritt nicht mehr zur Verfügung steht. HSK: Homoserinkinase, LUCF: Luciferase

<b>ATP</b>	0,1 mM in H <sub>2</sub> O, neutralisiert mit NaOH
<b>BSA</b>	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>5x Reaktionspuffer</b>	125 mM Tricine 25 mM MgSO <sub>4</sub> 0,5 mM EDTA pH 8,0 20 % Glycerin 40 % Ethylenglykol 0,5 mg/ml BSA
<b>Luciferase-Mix</b>	1x Reaktionspuffer 1 mM DTT 1,25 µg/ml Rekombinante Luciferase ( <i>Photinus pyralis</i> ) 23,4 µg/ml Luciferin 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>



**Pipettierschema für 384er MTPs:**

	Substrat-Mix	Enzym-Mix	Endkonz.
Homoserin	5 $\mu$ l		
ATP		0,5 $\mu$ l	2 $\mu$ M
BSA		2 $\mu$ l	1 $\mu$ g pro Kavität
Enzym(20 ng/ $\mu$ l)		5 $\mu$ l	100 ng pro Kavität
HMKG-Puffer	15 $\mu$ l	34,5 $\mu$ l	

Zur Durchführung des Assays werden 5  $\mu$ l Prüfsubstanzen vorgelegt. Dazu kommen 20  $\mu$ l Substratlösung und 25  $\mu$ l Enzym-Mix. Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 37 °C werden 50  $\mu$ l Luciferase-Mix hinzugegeben und sofort die Lumineszenz bestimmt.

**2.14.3 Threonindehydratase**

Die Threonindehydratase katalysiert den ersten Schritt der Isoleucinbiosynthese. Sie wandelt Threonin in 2-Oxobutyrat um. Der entwickelte Assay weist direkt das entstandene Produkt durch Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin nach. Wie für den gekoppelten Assay der Homoserinkinase beschrieben, entsteht dadurch ein Hydrazon, daß im alkalischen Milieu zu einer Rotfärbung führt [Friedemann and Haugen, 1943].

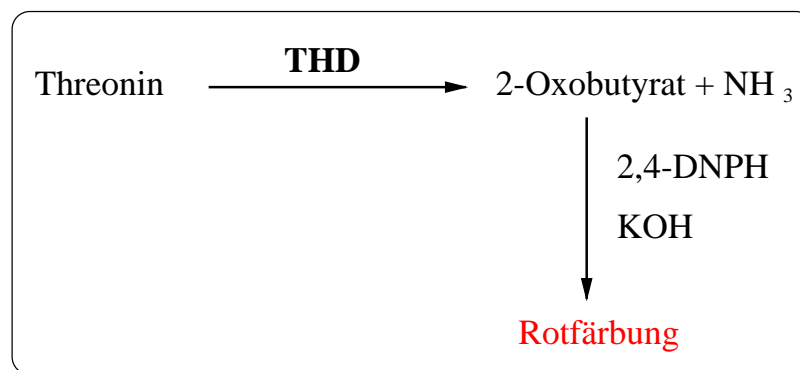


Abbildung 2.4: Assay zur Aktivitätsbestimmung der Threonindehydratase. KOH: Kaliumhydroxid, 2,4-DNPH: 2,4-Dinitrophenylhydrazin, THD: Threonindehydratase

**Lösungen für den Enzymassay:**

<b>TKEDE-Puffer</b>	150 mM Tris HCl pH 9,0 200 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3 mM EDTA pH 9,0 0,5 mM DTT 20 % Ethylenglykol
<b>Threonin</b>	50 mM in H <sub>2</sub> O
<b>Valin</b>	10 mM in H <sub>2</sub> O
<b>Pyridoxal-5-phosphat</b>	125 µM in H <sub>2</sub> O
<b>BSA</b>	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>2,4-DNPH</b>	0,1 % in 2 M HCl
<b>KOH</b>	2,5 M Kaliumhydroxid

**Pipettierschema für 384er MTPs:**

	<b>Substrat-Mix</b>	<b>Enzym-Mix</b>	<b>Endkonz.</b>
Threonin	0,6 µl		1 mM
L-Valin		1,3 µl	0,65 mM
Pyridoxal-5-phosphat		0,6 µl	3,75 µM
BSA		0,6 µl	6 µg pro Kavität
Enzym(4 ng/µl)		5 µl	20 ng pro Kavität
TKEDE-Puffer	19,4 µl	12,5 µl	

Substrat-Mix und Enzym-Mix werden zu 5 µl Prüfsubstanz pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 20 µl 2,4-Dinitrophenylhydrazin hinzugegeben und nach weiteren 20 min bei RT der Farbumschlag durch die Zugabe von 35 µl Kaliumhydroxid herbeigeführt.

### 2.14.4 Der Z-Faktor

Zur Beurteilung eines HTS-Assays ist der Z-Faktor eingeführt worden [Zhang et al., 1999]. Der Z-Faktor ist eine statistische Größe, die sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen der Meßwerte mit und ohne Enzym bzw. mit und ohne Hemmstoffe berechnet. In der Abbildung 2.5 ist die statistische Auswertung eines Assays schematisch dargestellt. Zwischen der Streuung um den Mittelwert der Kontrolle und der Streuung um den Mittelwert der Probe muß ein genügend großes Messfenster bleiben. Nur so lassen sich Hemmstoffe im HTS-Assay eindeutig identifizieren. In der Formel 2.1 ist die genaue Berechnung des Z-Faktors angegeben [Zhang et al., 1999].

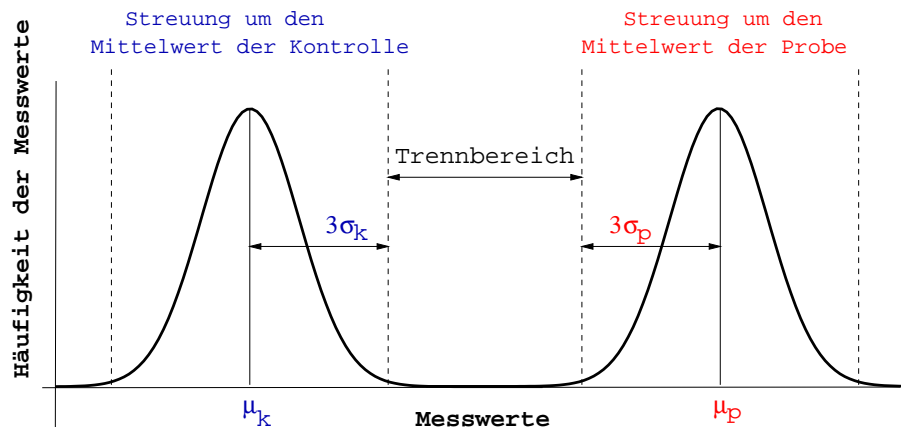


Abbildung 2.5: Berechnung des Z-Faktors zur Bewertung der Assayqualität.  $\mu$ : Mittelwert der Messung,  $\sigma$ : Standardabweichung der Messwerte, abgeändert nach [Zhang et al., 1999]

$$Z - Faktor = 1 - \frac{(3\sigma_k + 3\sigma_p)}{|\mu_k - \mu_p|} \quad (2.1)$$

Ein idealer Assay hat einen Z-Faktor, der um 1 liegt. Zwischen 1 und 0,5 sind Assays gut durchführbar. Sinkt der Z-Faktor unter 0,5 ab, so wird der Trennbereich zwischen Kontrolle und Probe zu klein. Es ist keine klare Unterscheidung zwischen ungehemmter und gehemmter Enzymaktivität mehr möglich.

## 2.15 Methoden der Bioinformatik

### 2.15.1 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurde das Wisconsin Package, Version 10, von der Genetics Computer Group verwendet [Devereux et al., 1984]. Es enthält unter anderem Programme zum Einlesen und Editieren von Sequenzen, zur Translation der DNA-Sequenz in die Proteinsequenz und zur Berechnung von Molekulargewichten.

### 2.15.2 Datenbankvergleich

Für die Suche nach homologen Sequenzen in Sequenz-Datenbanken wurde Gapped-BLAST (*Basic local alignment tool*) am NCBI (Web-Interface) oder als Standalone-Software vom NCBI verwendet [Altschul et al., 1990, Altschul et al., 1997]. Das Softwarepaket enthält u. a. das Programm *formatdb*, mit dem man eine eigene Datenbank erstellen kann und *blastall*, mit dem Sequenzen gegen diese Datenbank geschickt werden können.

### 2.15.3 Multiple Alignments

Voraussetzung für die phylogenetische Analyse der Sequenzen ist die Berechnung eines multiplen Alignments. Dazu wird ClustalW [Higgins and Gibson, 1994] eingesetzt, das ein multiples Alignment über einen Neighbor-joining-Baum [Saitou and Nei, 1987] berechnet. Zur Berechnung des multiplen Alignments werden die entsprechenden Sequenzen im Fasta-Format in einer Datei abgespeichert. Im folgenden ist ein Beispiel für eine solche Datei gezeigt.

#### Fasta-Format: Beispiel für eine Datei im Fasta-Format.

```
>HIS4_BUCAI EC 5.3.1.16 [Buchnera aphidicola]
MIIPAFDLINGRTVRLYQGDYSNQKNYNVNLFNLSLEVYKSKGIEIVHLVDLDGAKNSANR
QIELFKKIVSHTTVPVQVGGGIRTTKDISTLLDLGVKRVVIGSSIVSNKKQVKQWLNFG
PDAIVLALDVHVDGSNKKEISIDGWQKKTNFLEEEIIEYFLSSGLKHLVCTDISRDGTL
LPNFKLYKEICSNFKNINFQASGGVASLQDIIFLKKTGVKSIIGRSLEKKFTIEEAVK
CWQRES
>HIS4_BACSU (O35006) EC 5.3.1.16 [Bacillus subtilis]
MSAFTLYPAIDMRNGKCVRLVQGDYDKETIYGDSPYDMAELFEKEGAEWIHLVDLDGAK
GKRVNDRHVIEIAQKLNKVEIGGGIRSENDVYEYLSAGVERVILGSSAVSNPPFVKKML
KQYGEKIAIGLDARNGFVSTEGWLETSTLKATELGKELANEGAEVFIPTDIATDGMLSGP
NVKSTVELAKETGKSVIASGGVSSVADLEALARNEADGVSGAIGKALYTNQFTLSEALE
RVKRK
>HIS4_SYNY3 (P74561) EC 5.3.1.16 [Synechocystis sp. (strain PCC 6803)]
MKILPAIDLLGGKCVRLYQGDYDQSQVYHEDPVEVARQWQAQGASRLHLVDLDGAKGQP
VNLTAIANIVEALTIPVQVGGGLRDRNRVKQLLDLGVGRVILGTIAVENPDLVGELCAEF
PGQIVVGIDARNGKVATRGLWLETSTVEAGELAQRMKLGAAAIYTDIHRDGTMQGPNLD
ALRQLASQLTIPVIASGGVSQVEDLLNLLSLESLGVNGVIIGKALYTGDIQLAEAIRAVG
NGRWQDVPLDFPRLG
```

Nach der Berechnung des multiplen Alignments mit ClustalW erhält man ein solches Bild:

**ClustalW:** Beispiel für ein multiples Alignment aus ClustalW

HIS4_BACSU	MSAFTLYPAIDMRNGKCVRLVQGDYDKETIYGDSPYDMAELFEKEGAEWIHLVDLDGAKE
HIS4_SYNY3	---MKILPAIDLLGGKCVRLYQGDYDQSQVYHEDPVEVARQWQAQGASRLHLVDLDGAKE
HIS4_BUCAI	---MIIPAFDLINGRTVRLYQGDYSNQKNYNVNLFNLSLEVYKSKGIEIVHLVDLDGAKN
HIS4_BACSU	GKRVNDRHVIEIAQKLNKVEIGGGIRSENDVYEYLSAGVERVILGSSAVSNPPFVKKML
HIS4_SYNY3	GQPVNLTAIANIVEALTIPVQVGGGLRDRNRVKQLLDLGVRVILGTIAVENPDLVGELC
HIS4_BUCAI	SANRQIELFKKIVSHTTVPVQVGGGIRTTKDISTLLDLGKRVVIGSSIVSNKKQVKQWL
HIS4_BACSU	KQYG-EKIAIGLDARNG-----FVSTEGWLETSTLKATELGKELANEGAEVFIFTDIATD
HIS4_SYNY3	AEFP-GQIVVGIDARNG-----KVATRGWLETSTVEAGELAQRMEKLGAAAIITYTDIHRD
HIS4_BUCAI	NFYGPDAIVLALDVHVDGSNKKEISIDGWQKKTNFIEETIEYFLSSGLKHLVLTDISRD
HIS4_BACSU	GMLSGPNVKSTVELAKETG-KSVIASGGVSSVADLEALARNEADGVSGAIGKALYTNQF
HIS4_SYNY3	GTMQGPNLDALRQLASQLT-IPVIASGGVSQVEDLLNLLSLESLGVNGVIGKALYTGDI
HIS4_BUCAI	GTLLGPNFKLYKEICSNFKNINFQASGGVASLQDIIFLK---KTGVKSIIIGRSLLEKKF
HIS4_BACSU	TLSEALERVKRK-----
HIS4_SYNY3	QLAEAIRAVGNRWQDVPPLDFPRLG
HIS4_BUCAI	TIEEAVKCWQRES-----

### Modifizierung des multiplen Alignments

Für die phylogenetische Analyse werden die multiplen Alignments, die mit dem Programm ClustalW erzeugt wurden, modifiziert. Als erstes wird mit dem Programm *clus2mol* das ClustalW-Format in das Molphy-Format umgewandelt.

Im zweiten Schritt werden mit dem Programm *rmindel* alle Spalten in dem Alignment gelöscht, die mindestens einen Gap (also eine Lücke) enthalten. So bleiben nur diejenigen Positionen im Alignment erhalten, die auch eine Information in Form einer Aminosäure tragen. Dadurch wird die Rechenzeit der anschließenden phylogenetischen Analyse erheblich beschleunigt. *Clus2mol* und *rmsindel* sind ein Bestandteil des Molphy-Pakets [Adachi and Hasegawa, 1992].

**Clus2mol:** Das gleiche Alignment wie oben im Molphy-Format

```

3 266

HIS4_BACSU
MSAFTLYPAIDMRNGKCVRLVQGDYNKETIYGDSPTYMAELFEKEGAEWIHLVDLDGAKE
GKRVNDRHVIEIAQKLNKVEIGGGIRSENDVYEYLSAGVERVILGSSAVSNPPFVKMML
KQYG-EKIAIGLDARNG-----FVSTEGWLETSTLKATELGKELANEGAEVFIFTDIATD
GMLSGPNVKSTVELAKETG-KSVIASGGVSSVADLEALARNEADGVSGAIIIGKALYTNQF
TLSEALERVKRK-----

HIS4_SYNY3
---MKILPAIDLLGGKCVRLYQGDYDQSQVYHEDPVEVARQWQAQGASRLHLVDLDGAKE
GQPVNLTAIANIVEALTIPVQVGGGLRDRNRVKQLLDLGVGRVILGTIAVENPDLVGELC
AEFP-GQIVVGIDARNG-----KVATRGWLETSTVEAGELAQRMEKLGAAAIITYDIHRD
GTMQGPNLDA LRQLASQLT-IPVIAAGVVSQVEDLLNLLSLESLGVNGVIGKALYTGDI
QLAEAIRAVNGRWQDVPPLDFPRLG

HIS4_BUCAI
----MIIPAFDLINGRTVRLYQGDYSNQKNYNVNLFNLSLEVYKSKGIEIVHLVDLDGAKN
SANRQIELFKKIVSHTTVPVQVGGGIRTTKDISTLLDLGVKRVVIGSSIVSNKKQVKQWL
NFYGPDAIVLALDVHVDGSGNKEISIDGWQKKTNFIEEIIIEYFLSSGLKHLVCTDISRD
GTLGPNFKLYKEICSNFKNINFQASGGVASLQDIIFLK---KTGVKSIIIGRSLLEKKF
TIEEAVKCWQRES-----

```

**Rmindsel:** Das gleiche Alignment nach dem Löschen aller Gaps.

```

3 238

HIS4_BACSU
TLYPAIDMRNGKCVRLVQGDYNKETIYGDSPTYMAELFEKEGAEWIHLVDLDGAKEGKRV
NDRHVIEIAQKLNKVEIGGGIRSENDVYEYLSAGVERVILGSSAVSNPPFVKMMLKQYG
EKIAIGLDARNGFVSTEGWLETSTLKATELGKELANEGAEVFIFTDIATDGMLSGPNVKS
TVELAKETGKSVIASGGVSSVADLEALAADGVSGAIIIGKALYTNQFTLSEALERVKRK

HIS4_SYNY3
KILPAIDLLGGKCVRLYQGDYDQSQVYHEDPVEVARQWQAQGASRLHLVDLDGAKEGQPV
NLTAIANIVEALTIPVQVGGGLRDRNRVKQLLDLGVGRVILGTIAVENPDLVGELCAEFP
GQIVVGIDARNGKVATRGWLETSTVEAGELAQRMEKLGAAAIITYDIHRDGTMGPNLDA
LRQLASQLTIPVIAAGVVSQVEDLLNLLSLGVNGVIGKALYTGDIQLAEAIRAVNG

HIS4_BUCAI
MIIPAFDLINGRTVRLYQGDYSNQKNYNVNLFNLSLEVYKSKGIEIVHLVDLDGAKNSANR
QIELFKKIVSHTTVPVQVGGGIRTTKDISTLLDLGVKRVVIGSSIVSNKKQVKQWLNFYG
DAIVLALDVHVDGSGNKEISIDGWQKKTNFIEEIIIEYFLSSGLKHLVCTDISRDGTLGPNFKL
YKEICSNFKNINFQASGGVASLQDIIFLKKTGVKSIIIGRSLLEKKFTIEEAVKCWQRE

```

**2.15.4 Phylogenetische Analysen**

Nach der Berechnung und Modifizierung des multiplen Alignments wird es für die phylogenetische Analyse mit dem Molphy-Paket [Adachi and Hasegawa, 1992] eingesetzt. Mit diesem Paket lassen sich Bäume nach dem Maximum-Likelihood-Prinzip berechnen [Felsenstein, 1981, Huelsenbeck, 1995]. Ziel dieser Methode

ist es, den Baum zu finden, der am wahrscheinlichsten die Verwandtschaft der untersuchten Sequenzen wiedergibt. Für das modifizierte Alignment wird dazu im ersten Schritt eine Distanzmatrix unter Verwendung der JTT-Matrix berechnet [Jones et al., 1992]. Aus der Distanzmatrix wird ein Neighbor-joining-Baum erzeugt, dessen Topologie Ausgangspunkt für die anschließende Topologie-Suche mit einem Maximum-Likelihood Optimierungskriterium ist. Dazu wird *protml* (aus dem Molphy-Paket) eingesetzt. Das Programm führt kein Bootstrapping [Felsenstein, 1985] durch, sondern schätzt mit der sogenannten RELL-Methode (*resampling of estimated log-likelihood*) einen Wert für 1000 Replikationen ab [Hasegawa and Kishino, 1994].

### 2.15.5 PERL und MySQL

Eine Datenbank ist eine Sammlung von Daten. Mit Hilfe eines DBMS (Data Base Management System) kann man auf große Datenmengen zugreifen und diese verwalten. Als Datenbank wird MySQL [Codd, 1970] benutzt, da mit MySQL ein gutes Verhältnis zwischen Leistungsfähigkeit und leichter Bedienbarkeit erreicht werden kann. MySQL ist ein relationales Datenbankmanagementsystem (RDBMS), mit dem man auf die Daten in einer relationalen Datenbank zugreifen kann. Für das Anlegen der notwendigen Tabellen, die Abfrage und das Verändern der Daten wird die *Structured Query Language* (SQL) verwendet.

Die in dieser Arbeit erstellte MySQL-Datenbank wird mit phpMyAdmin verwaltet, ein Administrationstool für Datenbanken, das unter anderem den Inhalt der Datenbank in Tabellenform in einem Webbrowser darstellt und auch Abfragen und Veränderungen ermöglicht. PhpMyAdmin kommuniziert mit der Datenbank über einen Webserver.

Programme, die die direkte Verarbeitung der Daten ermöglichen, werden in Form von Perl-Skripten programmiert. Dadurch wird die automatische Verarbeitung der Daten mit entsprechendem Datendurchsatz vor allem beim Vergleich mit anderen Datenbanken ermöglicht. Perl (*Practical Extraction and Report Language*) wurde von Larry Wall entwickelt [Wall and Schwartz, 2001] und ist eine Skriptsprache. Derartige Programmiersprachen werden nicht kompiliert und damit zur Laufzeit ausgeführt. Dies geschieht mit Hilfe eines Perl-Interpreters.

### 2.15.6 Automatische phylogenetische Analyse

In der Abbildung 2.6 ist die Vorgehensweise für die automatische Analyse schematisch dargestellt.

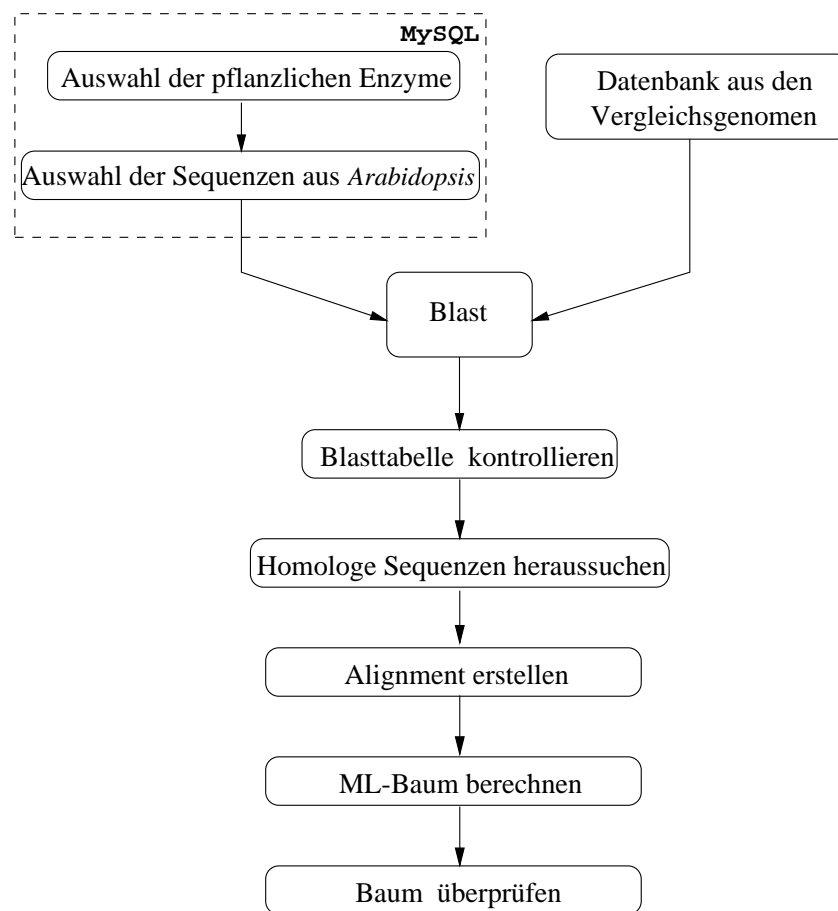


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur automatischen phylogenetischen Analyse.

**Auswahl der Enzyme** Zu Beginn der Analyse wurden alle bekannten Enzyme aus der Aminosäuresynthese bei Pflanzen zusammengestellt und in eine MySQL-Datenbank eingetragen. Dazu wurden unter anderem in folgenden Datenbanken recherchiert:

- Literaturdatenbank PubMed am NCBI  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
- ENZYME Enzyme nomenclature database  
<http://www.expasy.ch/enzyme/>
- HORT640C - Metabolic Plant Physiology Course am Department of Horticulture and Landscape  
<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/enzymes/enzymes.htm>



- KEGG Metabolic Pathways  
<http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>
- Pfam: Protein families database of alignments and HMMs  
<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>
- LIGAND, Database for enzymes, compounds, and reactions  
<http://www.genome.ad.jp/dbget/ligand.html>
- EcoCyC database, Pathway Tools Query Page  
<http://ecocyc.org:1555/server.html?>
- Introduction to Amino Acid Metabolism  
<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/amino-acid-metabolism.html>
- Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) am NCBI  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/COG/palox?fun=E>
- Metabolic Database (component of SoyBase)  
<http://cgsc.biology.yale.edu/metab.html>
- ERGO  
<http://wit.integratedgenomics.com/IGwit/>

**Auswahl der Gene** Anschließend wurden in einer Datenbankrecherche alle zugehörigen Gene zu den ausgewählten pflanzlichen Enzymen herausgesucht und ebenfalls in die MySQL-Datenbank eingetragen.

**Auswahl der Genome** Für die Analyse der pflanzlichen Enzyme wurden nur komplett sequenzierte Genome ausgewählt (siehe Tabelle 2.1). Die Proteinsequenzen der vollständig sequenzierten Genome stammen entweder von der Proteom-Datenbank des *European Bioinformatics Institute* (EBI, Cambridge, UK) oder aber aus der Genom-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Maryland, USA). Es wurden alle komplett sequenzierten Eubakterien und Archaeobakterien ausgewählt sowie vier eukaryotische Genome (*Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster*). Dazu kommen alle verfügbaren, sequenzierten Plastidengenome und das mitochondriale Genom des Protisten *Reclinomonas americana*.

Organismus	Datenquelle	Anzahl der Proteine	Taxonomie
<i>Aeropyrum pernix</i>	Proteom, EBI	2699	Archaeobakt.
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Proteom, EBI	2400	Archaeobakt.
<i>Halobacterium</i> sp.(Stamm NRC-1)	Proteom, EBI	2425	Archaeobakt.
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Proteom, EBI	1638	Archaeobakt.
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Proteom, EBI	1869	Archaeobakt.
<i>Pyrococcus abyssi</i>	Proteom, EBI	1765	Archaeobakt.
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Proteom, EBI	2066	Archaeobakt.
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Genom, NCBI	2977	Archaeobakt.
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Proteom, EBI	1479	Archaeobakt.
<i>Thermoplasma volcanium</i>	Genom, NCBI	1526	Archaeobakt.
<i>Aquifex aeolicus</i>	Proteom, EBI	1550	Eubakt.
<i>Bacillus halodurans</i>	Proteom, EBI	4008	Eubakt.
<i>Bacillus subtilis</i>	Proteom, EBI	4099	Eubakt.
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Proteom, EBI	1251	Eubakt.
<i>Buchnera aphidicola</i>	Proteom, EBI	573	Eubakt.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Proteom, EBI	1613	Eubakt.
<i>Caulobacter crescentus</i>	Proteom, EBI	3718	Eubakt.
<i>Chlamydia muridarum</i>	Proteom, EBI	919	Eubakt.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> Stamm AR39	Proteom, EBI	1110	Eubakt.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> Stamm CWL029	Proteom, EBI	1052	Eubakt.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> Stamm J138	Proteom, EBI	1069	Eubakt.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Proteom, EBI	895	Eubakt.
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Genom, NCBI	3672	Eubakt.
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Proteom, EBI	3084	Eubakt.
<i>Escherichia coli</i> Stamm K12	Proteom, EBI	4364	Eubakt.
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Genom, NCBI	5361	Eubakt.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteom, EBI	1495	Eubakt.
<i>Helicobacter pylori</i> Stamm 26695	Proteom, EBI	1555	Eubakt.
<i>Helicobacter pylori</i> Stamm J99	Proteom, EBI	1488	Eubakt.
<i>Lactococcus lactis</i> (subsp. lactis)	Proteom, EBI	2224	Eubakt.
<i>Mesorhizobium loti</i>	Genom, NCBI	6752	Eubakt.
<i>Mycobacterium leprae</i>	Proteom, EBI	1591	Eubakt.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Proteom, EBI	3747	Eubakt.
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Proteom, EBI	460	Eubakt.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Proteom, EBI	687	Eubakt.
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Genom, NCBI	782	Eubakt.
<i>Neisseria meningitidis</i> (serogroup A)	Proteom, EBI	2039	Eubakt.
<i>Neisseria meningitidis</i> (serogroup B)	Proteom, EBI	1967	Eubakt.
<i>Pasteurella multocida</i>	Proteom, EBI	2015	Eubakt.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteom, EBI	5556	Eubakt.
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Proteom, EBI	834	Eubakt.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SymA	Genom, NCBI	1294	Eubakt.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> chromosome	Genom, NCBI	3341	Eubakt.
<i>Staphylococcus aureus</i> Stamm N315	Proteom, EBI	2617	Eubakt.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Genom, NCBI	2094	Eubakt.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Proteom, EBI	1690	Eubakt.
<i>Synechocystis</i> sp. (Stamm PCC 6803)	Proteom, EBI	2796	Eubakt.
<i>Thermotoga maritima</i>	Proteom, EBI	1851	Eubakt.
<i>Treponema pallidum</i>	Proteom, EBI	1029	Eubakt.
<i>Ureaplasma parvum</i>	Proteom, EBI	611	Eubakt.
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteom, EBI	3785	Eubakt.
<i>Xylella fastidiosa</i>	Proteom, EBI	2774	Eubakt.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteom, EBI	25851	Eukaryot

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Organismus	Datenquelle	Anzahl der Proteine	Organell
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteom, EBI	19387	Eukaryot
<i>Drosophila melanogaster</i>	Proteom, EBI	13841	Eukaryot
<i>Homo sapiens</i>	Proteom, EBI	20142	Eukaryot
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Proteom, EBI	6213	Eukaryot

Organismus	Datenquelle	Anzahl der Proteine	Organell
<i>Astasia longa</i>	Genom, NCBI	46	Chloroplast
<i>Chlorella vulgaris</i>	Genom, NCBI	174	Chloroplast
<i>Cyanidium caldarium</i>	Genom, NCBI	197	Chloroplast
<i>Cyanophora paradoxa</i>	Genom, NCBI	149	Chloroplast
<i>Epifagus virginiana</i>	Genom, NCBI	25	Chloroplast
<i>Euglena gracilis</i>	Genom, NCBI	66	Chloroplast
<i>Guillardia theta</i>	Genom, NCBI	147	Chloroplast
<i>Lotus japonicus</i>	Genom, NCBI	83	Chloroplast
<i>Marchantia polymorpha</i>	Genom, NCBI	89	Chloroplast
<i>Mesostigma viride</i>	Genom, NCBI	105	Chloroplast
<i>Nephroselmis olivacea</i>	Genom, NCBI	155	Chloroplast
<i>Nicotiana tabacum</i>	Genom, NCBI	101	Chloroplast
<i>Odontella sinensis</i>	Genom, NCBI	140	Chloroplast
<i>Oenothera elata subsp. hookeri</i>	Genom, NCBI	118	Chloroplast
<i>Oryza sativa</i>	Genom, NCBI	108	Chloroplast
<i>Pinus thunbergii</i>	Genom, NCBI	160	Chloroplast
<i>Porphyra purpurea</i>	Genom, NCBI	209	Chloroplast
<i>Toxoplasma gondii</i>	Genom, NCBI	26	Chloroplast
<i>Triticum aestivum</i>	Genom, NCBI	84	Chloroplast
<i>Zea mays</i>	Genom, NCBI	111	Chloroplast
<i>Reclinomonas americana</i>	Genom, NCBI	67	Mitochondrion

Tabelle 2.1: Liste aller verwendeten Spezies mit der dazugehörigen Datenquelle und der ANzahl der im Genom identifizierten Proteine

Insgesamt wurden 79 Genome zur Datenanalyse eingesetzt. Davon stammen 10 aus Archaeobakterien, 42 aus Eubakterien und 5 aus Eukaryoten. Hinzu kommen 22 Organellengenome (21 Plastiden und ein Mitochondrion). Um die Herkunft der Datensätze eindeutig zu identifizieren, wird mit Hilfe eines Perl-Programms (`add_species_name.pl`) hinter jede einzelne Sequenz der Speziesname geschrieben. Der gesamte Datensatz besteht aus 203.965 Proteinen, die alle in eine Datei geschrieben wurden. Aus dieser Datei wird mit *formatdb* aus dem BLAST-Softwarepaket (siehe Kapitel 2.15.2) eine Datenbank für BLAST erstellt. Es wurde *formatdb* mit folgenden Optionen verwendet:

```
formatdb -i all.fasta -t all_proteomes -p T -o T
```

Optionen:

```
-i Inputfile
-t title for database
-p type of file (protein TRUE)
-o T parse options, creates index
```

**Suche nach homologen Sequenzen: BLAST** Für den automatischen Sequenzvergleich aller ausgewählten Gene aus *Arabidopsis* wurde das Programm *extract\_seq\_from\_MySQL\_and\_Blast.pl* geschrieben, das die Sequenzen einzeln aus der MySQL-Datenbank herausholt und einen Vergleich durchführt. Das Ergebnis wird in eine Datei geschrieben, die nach der Accessionnummer des Gens benannt wird. In dem Programm wird folgender Aufruf für den Sequenzvergleich verwendet:

```
blastall -M BLOSUM62 -p blastp -d all.tfa -F T
        -i test.seq -o test.blastp
```

Optionen  
-M Matrix  
-p Program Name  
-d database  
-F Filter TRUE  
-i Query File  
-o Blast Report Output File

Jede Ergebnisdatei aus der Homologiesuche wird nach Accessionnummer der Treffersequenz, der Länge des Treffers (*Length*), dem Score, dem E-Wert (*Expect*), der Identität (*Identity*) und der Ähnlichkeit (*Positives*) durchsucht und das Ergebnis in eine neue Datei geschrieben. Diese Tabelle wird per Hand kontrolliert. Falsche positive Treffer werden gelöscht. Dazu gehören z. B. ähnliche Sequenzen eines anderen pflanzlichen Enzyms. Anschließend wird die Spalte mit den Accessionnummern der Treffer aus der Tabelle extrahiert und in eine neue Datei geschrieben.

Das Programm *get\_seq\_from\_hits.pl* liest diese Datei ein und extrahiert automatisch alle Treffersequenzen aus dem Datensatz der Genome. Die Treffer werden dabei automatisch einzeln in einer Datei im Fasta-Format gespeichert.

**Erstellen des multiplen Alignments** Alle einzelnen Treffer im Fasta-Format werden für jedes Gen aus *Arabidopsis* in eine große Datei geschrieben (*create\_tfa\_file.pl*). Anschließend wird diese Datei an *ClustalW* übergeben und ein multiples Alignment berechnet (*compare\_data.pl*). Es werden die Voreinstellungen von *ClustalW* nicht verändert, die Ausgabe des multiplen Alignments erfolgt im *ClustalW*-Format. In dem Perl-Programm wird das Programm folgendermaßen aufgerufen:

```
clustalw ALIGN -INFILE=test.tfa
```

**Berechnung des ML-Baumes** Folgende Schritte wurden zur Berechnung des ML-Baumes von dem Programm `make_tree.pl` automatisch für jedes Alignment durchgeführt:

1. \*.aln in infile kopieren  
Beispiel: `cp AB1234.aln infile`
2. Umwandeln in Molphy-Format: `clus2mol`  
Beispiel: `clus2mol.pl infile > infile.new`
3. Insertionen/Deletionen löschen: `rminsd`  
Beispiel: `rminsd.pl infile.new > infile.cut`  
`cp infile.cut infile`
4. Distanz berechnen  
Beispiel: `protml -fD infile > infile.dis`
5. NJ-Baum erzeugen  
Beispiel: `njdist -t infile infile.dis > infile.nj`
6. Topologie-Suche mit Maximum-Likelihood Kriterium  
Beispiel: `protml -fR infile infile.tpl > infile.ml`
7. Dateien sichern (Beispiel):  
`cp infile.dis AB1234.aln.infile.dis` (Distanzmatrix)  
`cp infile.ml AB1234.aln.infile.ml` (ML-Ausgabedatei)  
`cp infile.nj AB1234.aln.infile.nj` (NJ-Ausgabedatei)  
`cp infile.tpl AB1234.aln.infile.tpl` (NJ-Topologie)  
`cp njdist.eps AB1234.aln.infile.eps` (NJ-Topologie im PS-Format)  
`cp protml.eps AB1234.aln.protml.eps` (ML-Topologie im PS-Format)  
`cp protml.tpl AB1234.aln.protml.tpl` (ML-Topologie)  
`cp protml.tre AB1234.aln.protml.tre` (ML-Topologie mit Astlängen)

In der Datei `protml.eps` befindet sich der berechnete Baum im Postscript-format. An den Ästen stehen jeweils die Accessionnummern der Spezies, diese werden mit den Speziesnamen von dem Programm `prettify_tree.pl` ergänzt, um den Baum einfacher lesbar zu machen. Ein Beispiel für einen ungewurzelten Baum zeigt die Abbildung 2.7.

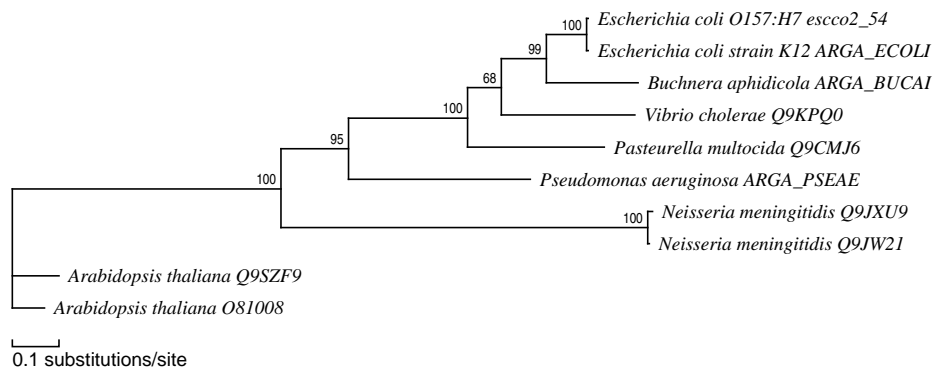


Abbildung 2.7: Beispiel für einen ungewurzelten, phylogenetischen Baum. Die Äste wurden mit den Speziesnamen beschriftet, an den Knoten stehen die dazugehörigen Bootstrapwerte.

# 3

## Ergebnisse

### 3.1 Klonierung der Gene

#### 3.1.1 Homoserinkinase, Threoninsynthase und Threonindehydratase

Die Gene für die drei Enzyme Homoserinkinase (HSK), Threonindehydratase (THD) und Threoninsynthase (THS) wurden parallel kloniert und werden daher hier gemeinsam beschrieben.

Für die Klonierung der Gene wurde zunächst eine cDNA-Bank aus den Blättern von *Arabidopsis thaliana* hergestellt. Der Titer der Bank lag bei  $4 \times 10^3$  pfu, die Insertionsrate bei 80 %.

Zur Hybridisierung wurden für jedes Gen Oligosonden (40-mere) entworfen, die aus der entsprechenden Nukleotidsequenz der Gene stammt. Für die Sonden wurde ein Abschnitt im N-terminalen Bereich des Gens gewählt, um die Wahrscheinlichkeit für einen vollständigen Klon zu erhöhen. Die Sonden für die jeweiligen Enzyme sind im Anhang aufgeführt (siehe Anhang B.1).

Für die Hybridisierung wurden jeweils 40 Platten mit je 4000 Rekombinanten ausplattiert und auf Nitrocellulosefilter übertragen. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Oligosonde erfolgte bei 60 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde für eine Stunde mit 1 l Waschlösung gewaschen und die Filter über Nacht exponiert. Es zeigten sich auf den Filtern für die HSK 4 Signale, für THD 7 Signale und für die THS ebenfalls 7 Signale.

Nach der Vereinzelung wurde ein Signal der HSK bestätigt, vier Signale der THD und sechs Signale der THS. Die entsprechenden Plaques wurden gepickt und über *in vivo* Excision die rekombinanten Plasmide (im pBluescript SK-) ausgeschleust. Die erhaltenen Klone wurden doppelsträngig radioaktiv sequenziert. Auf diese Weise konnte für jedes gesuchte Enzym ein vollständiges Gen isoliert

werden.

### 3.1.2 N-Acetylglutamatkinase

Die Klonierung der N-Acetylglutamatkinase wurde in einem ersten Ansatz über eine heterologe Hybridisierung versucht. Dazu wurde freundlicherweise von Prof. W. Martin das Gen für die N-Acetylglutamatkinase aus *Oryza sativa* zur Verfügung gestellt. Leider konnten auf diese Weise nur unvollständige Klone in der cDNA-Bank gefunden werden.

Da im Rahmen der Genomprojekte in der Zwischenzeit die Sequenz der N-Acetylglutamatkinase aus *Arabidopsis thaliana* veröffentlicht wurde und in dem Gen keine Introns enthalten sind, wurde in einem zweiten Ansatz das Gen über die PCR mit homologen Primern aus genomischer DNA (freundlicherweise von Dr. S. Schäfer zur Verfügung gestellt) amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde in den Vektor pCRBlunt II TOPO kloniert. Durch doppelsträngige Sequenzierung wurde die Identität der Insertion bestätigt.

## 3.2 Expression der Enzyme in *E. coli*

Zur Expression der Enzyme wurden alle Gene in Vektoren des pet-Expressionssystems kloniert. Infolgedessen tragen die Proteine alle am N-Terminus einen sechsfachen Histidinrest (kurz His-Tag). Es wurden homologe Primer mit entsprechenden Schnittstellen für die Klonierung entworfen (siehe Anhang B.2.2). Die PCR-Amplifikate wurden in pCRBlunt II TOPO kloniert, mit den jeweiligen Restriktionsenzymen in einem quantitativen Ansatz herausgeschnitten, aufgereinigt und in den vorbereiteten pet-Vektor ligiert.

### 3.2.1 Expression mit und ohne Transitpeptid

Für die Expression der Enzyme HSK, THD und THS wurden zwei Konstrukte in den pet-Vektor kloniert. Je ein Konstrukt enthielt das Gen in voller Länge und eines wurde am N-terminalen Bereich um das Signalpeptid gekürzt. Die NAGK wurde nur ohne Signalpeptid exprimiert. Zur Ermittlung des Signalpeptides wurde mit allen anderen bekannten Sequenzen ein multiples Alignment erstellt.

**Anfangsbereich des multiplen Alignments für die NAGK** In der Sequenz aus *Arabidopsis* ist der Teil des Gens unterstrichen (62 Aminosäuren), der bei der Klonierung ohne Transitpeptid nicht berücksichtigt worden ist. Aus Platzgründen



ist das multiple Alignment in dieser Darstellung im vorderen Bereich etwas gekürzt worden.

```

ARGB_SYNY3      -----MSSTQDYIGEEAATRVKILSEALPYIQHFAGRTVVVKYGGGAAMKDS
ARGB_PORPH      -----MLTNTERVKVLSDVT-ILQKFSSRIIVIKYGGGAAMKNQ
Arabidopsis     ...HRLGFSIKATVSTPPSIATGNAPSPDYRVEILSESLPFIQKFRGKTIVVKYGGGAAMTSP
ARGB_CYANI      -----MNNKSIRTQILIEALPYIQFGRGAIFVIKYGGGAAMKDL
ARGB_METTH      -----MKTVNILVEALPYIKKFHRKKIMIKYGGHAMIDE
ARGB_ARCFU      -----MENVELLIEALPYIKDFHSTMTVIKIGGHAMVND
ARGB_METJA      -----MGMDMIEKAEILMEALPFIQKFGYKIFVIKYGGHAMIDE
ARGB_AQUAE      -----MNELIEKAKVLQEALPYIREFHGKVVFVIKYGGGSAMHDE
ARGB_THEMEA     -----MRIDTVNVLLEALPYIKEFYGKTFVIKFGGSAMKQE
ARGB_NEISS      -----MESENIISAADKARILAEALPYIRRFSGSVAVIKYGGNAMTEP
ARGB_MYCTU      -----MSRIEALPTHIKAQVLAELPWLKQLHGKVVVKYGGNAMTDD
ARGB_CAULO      -----MTDVAEEAGWATAKTAEALPYIQIYDRETVVIKYGGHAMGQE
ARGB_CAMPYL     -----MIMQKYLEKANVLEALPYIKRFNSKIILIKYGGGSAMENE
ARGB_LACLA      -----MRDSQNTAQTLESKYFLKYRDQTVVIKYGGNAMIDE
ARGB_BACSU      -----MKKTIVFKCGGSVIR--
ARGB_STAPHYLO   -----MKFIVIKIGGSTLS--
ARGB_ECOLI      -----MMNPLI IKLGGVLLDSE
ARGB_BUCAI      -----MNPLVIKLGGLVLES
ARGB_PASMU      -----MKPLVIKLGGLVLDTP

```

**Anfangsbereich des multiplen Alignments für die HSK** In der pflanzlichen Sequenz ist der Teil des Gens unterstrichen (45 Aminosäuren), der bei der Klonierung ohne Transitpeptid nicht berücksichtigt worden ist.

```

KHSE_AQUAE      -----MIKIEVPA
KHSE_YEAST      -----VRAFKIKVPA
KHSE_MYCLE      -----MVT-WMLPAGLVASAVVAA
KHSE_MYCTU      -----MVTQALLPSGLVASAVVAA
KHSE_SYNY3      -----MVS----FTVSVPA
KHSE_DEIRA      -----MSSPARPFTVRAPA
KHSE_BACSU      -----MNEADMLFSVTVP
KHSE_BACHD      -----MTLPFQITVP
KHSE_LACLA      -----MKIIVPA
KHSE_HELPY      -----MVVSVP
KHSE_HELPJ      -----MVVSVP
KHSE_CAMJE      -----MKILVPA
Arabidopsis     MASLCFQSPSKPISYFQPKSNPPLFAKVSVFRCRASVQTLVAVEPEPVFVSVKTFAPA
KHSE_PYRAB      -----MKKRIYAPA
KHSE_PYRHO      -----MR IKVRAPA
KHSE_HALN1      -----MVVTVRAPA
KHSE_METJA      -----MKVRVKAPC
KHSE_THEAC      -----MPQVKVTASAPC
KHSE_AERPE      -----MGCLRALACSRARARAYS
KHSE_ECOLI      -----MVKVYAPA
KHSE_VIBCH      -----MSVVVYAPA
KHSE_PASMU      -----MLRIYAPA
KHSE_HAEIN      -----MLRIYAPA
KHSE_BUCAI      -----MIKIYAPA
KHSE_THEMEA     -----MKVLVPA

```

**Anfangsbereich des multiplen Alignments für die THD** Aus Platzgründen wurde der vordere Teil des multiplen Alignments gekürzt. In der restlichen Sequenz ist der Teil des Gens unterstrichen (91 Aminosäuren), der bei der Klonierung ohne Transitpeptid nicht berücksichtigt worden ist.

```

THD2_ECOLI      -----MHITYDLPVAIDDIIEAKQRLAGRIYKTGMPSRNY
THD_CAULOB      -----MTVSLADIQAAAVRLKGSVETPLIESPA
THD_BACSU       -----MKPLLKENS LIQVKHILKAHQNVKDVVIHTPLQRNDR
THD_BACHAL      -----MGKIQIEDIIIANQTLKDVVHTPLQKNQV
THD_MYCTU       -----MSAELSQSPSSSPLFSLSGADIDRAAKRIAPVVTPTPLQPSDR
THD_VIRBRIO     -----MGLTNQTGAEYLRQILR--SPVYEAVNTPLQTMPR
THD1_ECOLI      -----MADSQPLSGAPEGAEYLRVLR--APVYEAAQVTPPLQKMEK
THD_HAEIN       -----MKNLLTNPQPSQSDYINAIVKLGSRVYEAQVTPPLQKMGK
THD_PSEUDOM     -----MLEQYVKKILT--SRVYDVAVETPLQPARQ
THD_SYN         -----MTTDYLERILK--ARVYDVAIETPLDLAAN
THD_NEISS       -----MNTPLPYSDYLIRILT--ASVYDVAVETPLEPARS
Arabidopsis     ....LPRLKVSPNSLQYPAGYLGAVPERTNEAENGSAEAMEYLTNLS--TKVYDIAIESPLQLAKK
THD_RICKET      -----MNLLQPPQNVAIAHNRIKQYINLTPIIHSES

```

**Anfangsbereich des multiplen Alignments für die THS** Auch in diesem gekürzten Alignment ist der Bereich des Transitpeptides (97 Aminosäuren) unterstrichen.

```

THRC_METJA      -----MLQRCIKCGKTYDVDEIIYTC-ECGGLLEIIYDYEEI
THRC_METH       -----MDGESVIRCISCGREYDLEEIIYTCRECGSVLEVECDVE--
THRC_PYROC      -----MVLRCVVCGREYPEDEVYRC-DCGGLLEVVIDLD--
THRC_ARCHAE     -----MYRLKCIIEGKEWGE--NYTC-ECGGLLEVEIDLD--
THRC_AEROP      -----MACGSKYPSSPRLFTCPKCGGLLEPFYIDG--
THRC2_RYROC     -----MKCPKCGREYKAEIPFCI--CGEELEITYDYS--
THRC_SYNE       -----MTTATTTAPEFISACTKLVSKEGNTYPLKALHICEETFAPLEVAVDYDLI
Arabidopsis     ....AVKPPHRTEDNIRDEARRNRSNAVNPFSAKYVPFNAAPGSTESYSLDEIVYRSRSGGLLDVEHDMREAL
THRC_HAEIN      -----MNLYN-IKHPEEQVTFQSQAVRQGLGRDQGLFFPEVIPQLN
THRC_VIBRIO     -----MKLYN-IKENDEQVSFGQAVRQGLGRNQGLFFPAQLPKFD
THRC_ECOLI      -----MKLYN-LKDHNEQVSFAQAVTQGLGKNQGLFFPHDLPEFS
THRC_BUCAI      -----MKLYN-LKNHNEQVNFEAAVKLGLGQQQGLFFPVLPITIT
THRC_CAMPYL     -----MKLVESRNVNN-VSSFKEALINPNAPEGGLYSPLNLPIFE
THRC_HELPJ      -----MPFVPTPSLKERKIDFIEAVLNPNAKGGGLYTLHFETLE
THRC_LACTO      -----MVFYQSTRDKSNKKTASQAILQGLAEDGGLFVPVDFPKVD
THRC_YEAST      -----MPNASQVYRSTRSSSPKTI SFEEAIIQGLATDGGLFIPPTIPQVD

```

Alle vier Enzyme konnten im pet-Expressionssystem erfolgreich exprimiert werden. Die Expression der Threoninsynthase wurde jedoch nicht weiterverfolgt, da es für einen Aktivitätsassay kein Substrat zur Verfügung stand und eine chemische Synthese des Substrates auch erfolglos blieb.

### Proteinausbeute

Aus Gründen der Aktivität und der Ausbeute in Vorversuchen wurde die HSK nur **ohne** Transitpeptid und die THD nur **mit** Transitpeptid für einen HTS-Assay optimiert. Alle drei Proteine wurden entsprechend den Angaben in Kapitel 2.13 über den N-terminalen His-Tag aufgereinigt. Dabei ergaben sich bei der NAGK 40 mg aktives Enzym pro Liter Expressionskultur, bei der THD 10 mg und bei der HSK 5 mg. Die drei folgenden Abbildungen zeigen die aufgereinigten Proteine auf einem Western-Blot, detektiert mit einem Antikörper gegen den 6x His-Tag.

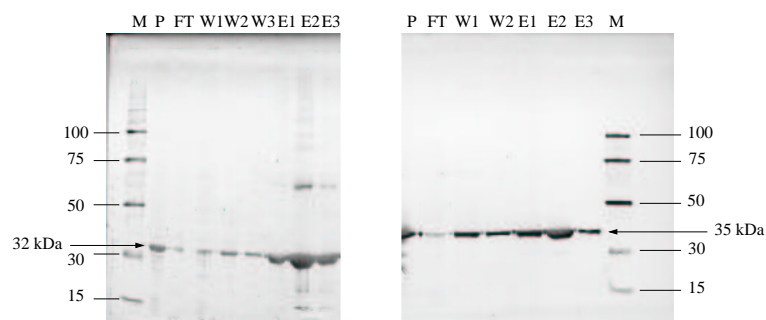


Abbildung 3.1: Aufreinigung der NAGK (links) und der HSK (rechts), gezeigt ist ein Western-Blot. **P**: Pellet nach dem Aufschluß der Zellen, **FT**: Durchfluß nach dem Batch an Ni-NTA, **W1**: erste Waschfraktion, **W2**: zweite Waschfraktion, **E1**: erste Elution, **E2**: zweite Elution, **E3**: dritte Elution, **M**: 6x His Protein Ladder (Qiagen)

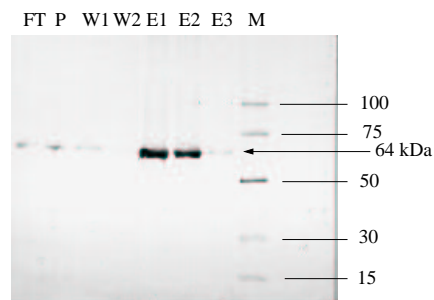


Abbildung 3.2: Aufreinigung der THD, gezeigt ist ein Western-Blot. **P**: Pellet nach dem Aufschluß der Zellen, **FT**: Durchfluß nach dem Batch an Ni-NTA, **W1**: erste Waschfraktion, **W2**: zweite Waschfraktion, **E1**: erste Elution, **E2**: zweite Elution, **E3**: dritte Elution, **M**: 6x His Protein Ladder (Qiagen)

### 3.3 Entwicklung eines HTS-fähigen Assays

#### 3.3.1 Die N-Acetylglutamatkinase

Die Aktivität der N-Acetylglutamatkinase wurde mit einem photometrischen Assay bestimmt, der auf der Bildung eines Hydrazons beruht [Lipmann and Tuttle, 1945]. In Vorversuchen wurde zunächst der optimale Messbereich bestimmt, in dem die Differenz zwischen der Extinktion ohne und mit Enzym ausreichend groß ist. Dabei ergab sich ein breites Fenster von 480 nm bis 530 nm. Alle weiteren Messungen fanden bei 485 nm statt. Die spezifische Aktivität der NAGK beträgt 10 U/mg Protein bei 37 °C.

Zur Optimierung des Assays wurden die  $K_m$ -Werte für den Cofaktors ATP und das Substrat N-Acetylglutamat ermittelt. Für das Substrat wurde Konzentration von 1  $\mu$ M bis 100 mM getestet und für den Cofaktor von 1  $\mu$ M bis 50 mM. In der Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse zu sehen. Der  $K_m$ -Wert liegt für N-Acetylglutamat bei 7 mM und für ATP bei 1 mM. Die Berechnung des  $K_m$ -Wertes erfolgte mit dem Programm GraFit.

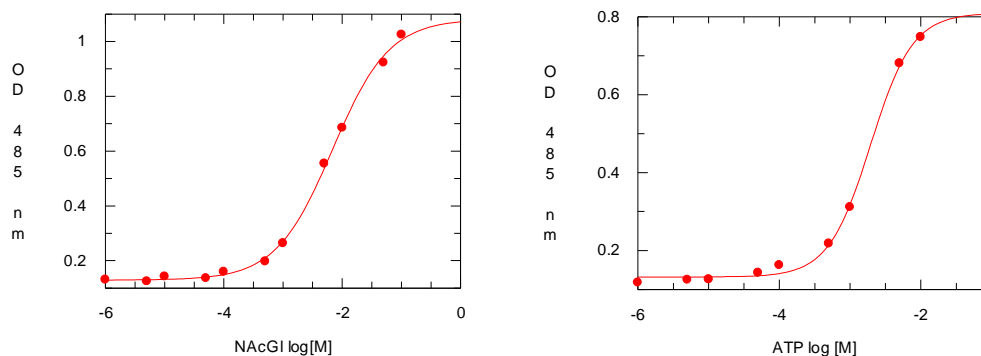


Abbildung 3.3: Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für N-Acetylglutamat (links) und ATP (rechts). Aufgetragen ist die Extinktion gegen den Logarithmus der Konzentration.

Für die Phosphorylierungsreaktion von Kinasen, die unter ATP-Verbrauch ablaufen, werden zweiwertige Ionen benötigt, da die aktive Form des ATPs als Komplex mit diesen vorliegt. Für die Kinasereaktion der HSK wird Magnesium in den Puffer gegeben. Zur Bestimmung der optimalen Magnesiumkonzentration wurde die Enzymaktivität bei Magnesiumkonzentrationen von 0 mM bis 30 mM gemessen (siehe Abbildung 3.4). Das Enzym wird durch Zugabe von Magnesium zunächst aktiviert. Wird die Konzentration zu hoch (> 5mM) wirkt das Magnesium allerdings hemmend.

Eine Erhöhung der Temperatur wirkt sich aktivitätssteigernd auf die NAGK aus. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, verdoppelt sich die Aktivität bei einer

Temperaturerhöhung von 22 °C auf 37 °C.

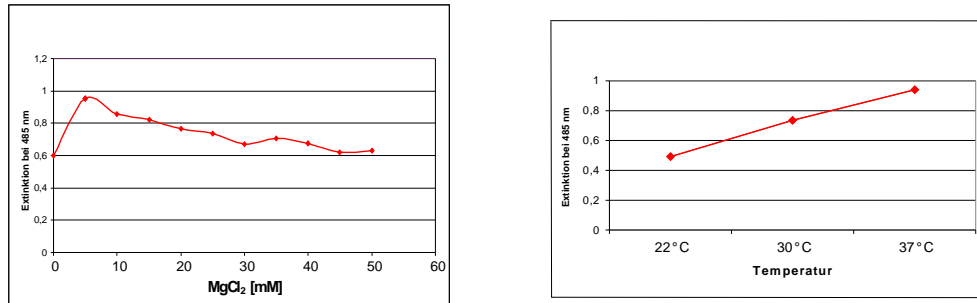


Abbildung 3.4: Abhängigkeit der Enzymaktivität von Magnesiumkonzentration (links) und Temperatur (rechts)

Ein wichtiger Punkt bei der Etablierung eines Enzymassays für ein Hochdurchsatzscreening (HTS) ist die DMSO-Toleranz des Enzyms, da die Testsubstanzen im HTS-Assay in DMSO verdünnt vorliegen. Zur Messung der DMSO-Toleranz wurden DMSO-Konzentrationen von 0,1 % bis 5 % getestet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5. Die Aktivität der NAGK wird vom DMSO kaum beeinträchtigt.

Abschließend wurde der Einfluß von Arginin auf die Aktivität der N-Acetylglutamatkinase gemessen, da das Enzym in dem Biosyntheseweg dieser Aminosäure eine Rolle spielt. Es wurden Argininkonzentrationen von 1  $\mu$ M bis 25 mM getestet. In geringen Konzentrationen wirkt Arginin aktivierend, bei einer höheren Konzentration tritt eindeutig eine Hemmung ein (siehe Abbildung 3.5).

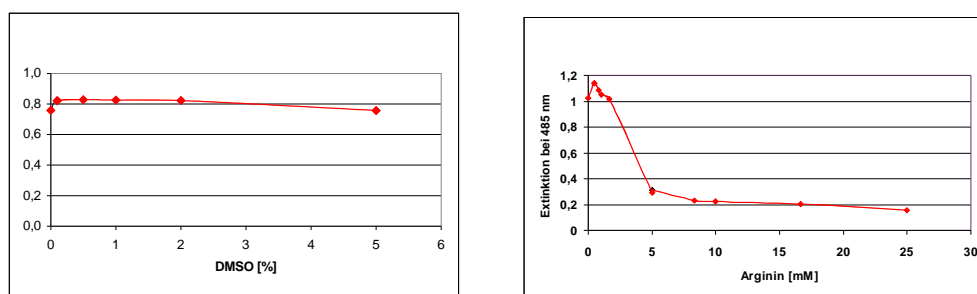


Abbildung 3.5: Bestimmung der DMSO-Toleranz der NAGK (links) und Hemmung der Enzymaktivität durch Arginin (rechts).

### 3.3.2 Homoserinkinase

Die Homoserinkinase wurde in zwei Assays auf ihre Aktivität hin untersucht. Der erste Assay ist ein gekoppelter, photometrischer Assay und der zweite ein luminometrischer Assay (siehe Kapitel 2.14.2).

#### Gekoppelter Assay

Messungen mit diesem Assay sind im Bereich von 480 nm bis 550 nm möglich, für die weiteren Messungen wurde eine Wellenlänge von 492 nm gewählt. Es wurde zunächst die Homoserinkinase (HSK) mit und ohne N-terminalem Transitpeptid exprimiert und aufgereinigt. Aktivitätstests mit beiden Enzymen zeigten, daß das Enzym ohne Transitpeptid eine wesentlich höhere Aktivität hat (8 U/mg Protein bei 37 °C) als das Enzym mit Transitpeptid (1 U/mg Protein bei 37 °C).

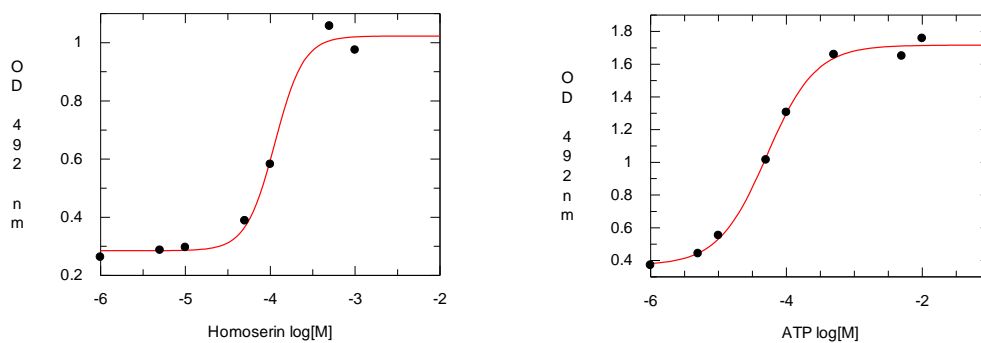


Abbildung 3.6: Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für Homoserin (links) und ATP (rechts). Aufgetragen ist die Extinktion gegen den Logarithmus der Konzentration.

Zur Bestimmung der  $K_m$ -Werte wurden Substratkonzentrationen zwischen 1  $\mu$ M und 1 mM getestet und ATP-Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 10 mM. In der Abbildung 3.6 ist das Ergebnis der Messungen zu sehen. Für Homoserin liegt der  $K_m$ -Wert bei 113  $\mu$ M und für ATP bei 52  $\mu$ M.

Zur Optimierung des Assays wurde desweiteren der Einfluß verschiedener Magnesiumkonzentrationen (von 0 mM bis 100 mM) gemessen. Die Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis. Es ist eine deutliche Aktivitätssteigerung bis 5 mM Magnesium zu sehen, danach sinkt sie ein wenig ab.

In der Abbildung 3.7 ist die Toleranz der HSK gegenüber DMSO zu sehen. Der Aktivität wird von DMSO-Konzentrationen bis zu 3 % nicht beeinflusst. Höhere Konzentrationen führen zu einer leichten Hemmung.

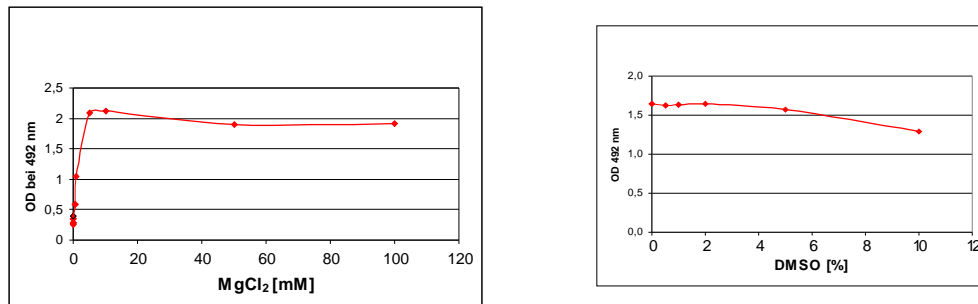


Abbildung 3.7: Einfluß verschiedener Konzentrationen Magnesium (links) und DMSO (rechts) auf die Aktivität der NAGK.

Im allgemeinen wird Glycerin und Ethylenglykol zur Stabilisierung von aufgereinigten Enzymen verwendet. Bei der HSK ist in Abhängigkeit von der Wahl des Stabilisators ein großer Unterschied in der Aktivität zu sehen. Die HSK ist aktiv, wenn Ethylenglykol im Reaktionspuffer ist. Die Aktivität ist jedoch wesentlich höher mit Glycerin im Assay (siehe Abbildung 3.8).

Da die Homoserinkinase in der Biosynthese der Aspartatfamilie eine Rolle spielt, wurde der Einfluß der in diesem Weg gebildeten Aminosäuren getestet. Weder Isoleucin noch Methionin und Threonin üben einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der HSK aus (bis zu einer Konzentration von 20 mM, siehe Abbildung 3.8).

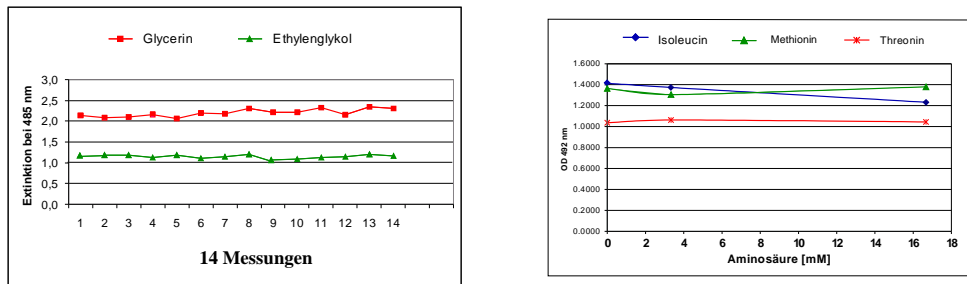


Abbildung 3.8: Einfluß von Glycerin (rote Kurve) und Ethylenglykol (grüne Kurve) auf die Aktivität der NAGK (links) und von verschiedenen Aminosäuren (rechts): rote Kurve: Threonin, Grüne Kurve: Methionin, Blaue Kurve: Isoleucin .

## Lumineszenz-Assay

Neben dem gekoppelten Assay wurde ein weiterer Assay für die HSK etabliert. Der Lumineszenzassay ist eine Alternative zum gekoppelten Assay und wurde

als ein vielfach verwendbarer Assay für Aktivitätsmessungen von Kinasen entwickelt. Der Assay ist relativ sensitiv und benötigt geringere Chemikalienkonzentrationen als der gekoppelte Assay.

Es wurde für diesen Assay ebenfalls der  $K_m$ -Wert des Homoserins bestimmt, der bei  $39 \mu\text{M}$  liegt (siehe Abbildung 3.9). Aufgrund der Sensitivität des Assays konnte kein  $K_m$ -Wert für ATP bestimmt werden, sondern nur der Bereich, in dem gemessen werden muß, um eine Signaldifferenz zu messen. Dies ist in der Abbildung 3.9 zu sehen. Gemessen wurde der Assay jeweils mit und ohne Substrat (Homoserin). Ist Homoserin vorhanden, kann es von der HSK unter ATP-Verbrauch phosphoryliert werden. Das Lumineszenzsignal ist schwach, weil für die Luciferase kein ATP übrig bleibt. Ist kein Homoserin im Ansatz, so wird das ATP von der HSK nicht verbraucht und steht der Luciferase zur Verfügung. Es kommt zu einem Lumineszenzsignal. Die Abbildung 3.9 verdeutlicht, daß nur in dem Bereich zwischen  $1 \mu\text{M}$  und  $5 \mu\text{M}$  eine Differenzierung der Signale möglich ist.

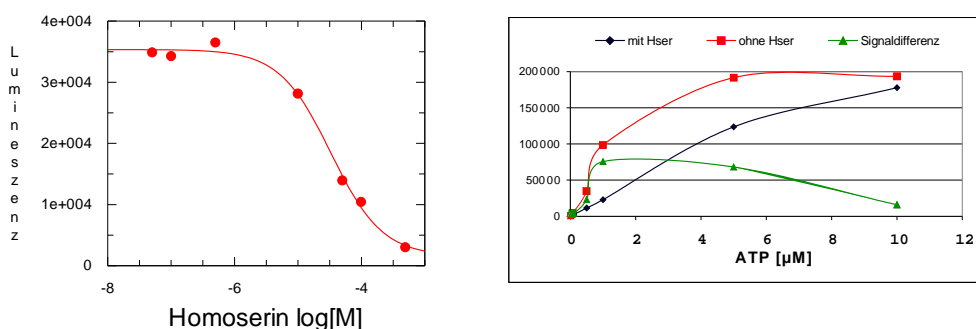


Abbildung 3.9: Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für Homoserin (links) und der optimalen ATP-Konzentration im Lumineszenzassay (rechts). Dazu wurde die Lumineszenz mit und ohne Homoserin im Ansatz gemessen. Ohne Homoserin (rechtes Bild, rote Kurve) steht der Luciferase das gesamte eingesetzte ATP zur Verfügung, mit Homoserin wird das ATP von der HSK verbraucht (rechtes Bild, blaue Kurve). Die grüne Kurve zeigt die Signaldifferenz der beiden Messungen an.

Nicht nur die Homoserinkinase, sondern auch die Luciferase darf sich nicht durch DMSO hemmen lassen. Daher wurde auch für dieses Enzym der Einfluß von DMSO ermittelt. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Offensichtlich wirken sich geringe DMSO-Konzentration sogar aktivitätssteigernd auf die Luciferase auf.

Eine Voraussetzung für einen HTS-Assay ist die Stabilität des Enzyms und aller Lösungen über mehrere Stunden. Hier zeigte sich, daß BSA einen stabilisierenden Einfluß auf das Enzym hat. Ohne BSA ist nach 18 h keine Aktivität mehr



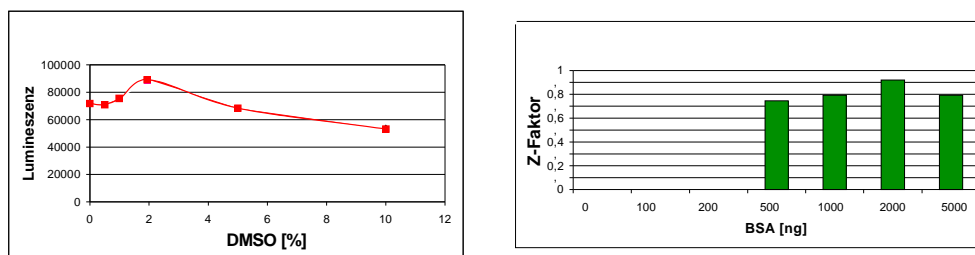


Abbildung 3.10: DMSO-Toleranz der Luciferase (links). Stabilisierung der HSK durch BSA (rechts), aufgetragen ist der Z-Faktor gegen die BSA-Menge nach 18 h.

vorhanden. Setzt man mindestens 500 ng BSA pro Kavität in einer Microtiterplatte ein, so ist der Z-Faktor durchaus zufriedenstellend (siehe Abbildung 3.10).

### 3.3.3 Threonindehydratase

Zur optimalen Aktivitätsbestimmung der Threonindehydratase (THD) wurde zunächst der optimale Messbereich bestimmt. Er liegt zwischen 480 nm und 550 nm. Alle weiteren Messungen wurden bei 485 nm durchgeführt. Auch für die Threonindehydratase wurden zwei Konstrukte für die Expression in *E. coli* kloniert: mit und ohne plastidärem Signalpeptid. Da das Enzym mit Transitpeptid eine wesentlich höhere Aktivität zeigte (7 U/mg Protein bei 37 °C) als das Enzym ohne (0,3 U/mg Protein bei 37 °C), wurden alle folgenden Versuche mit diesem Enzym durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimalen Enzymmenge im Assay wurde eine Versuchsreihe mit Enzymmengen von 1 ng bis 1 mg in 100  $\mu$ l Assayvolumen getestet. Die Aktivität steigt zunächst mit zunehmender Enzymmenge an und erreicht ihr Maximum bei 50 ng. Danach sinkt sie wieder ab (siehe Abbildung 3.11).

In Abbildung 3.11 ist auf der rechten Seite die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für Threonin dargestellt. Gemessen wurden Threoninkonzentrationen von 1  $\mu$ M bis 1 mM. Es ergab sich ein  $K_m$ -Wert von 925  $\mu$ M Threonin.

Da im HTS-Assay die Testsubstanzen in DMSO gelöst vorliegen, wurde auch für die THD die DMSO-Toleranz bestimmt. DMSO-Konzentrationen bis zu 2 % wirken sich nicht auf die Enzymaktivität aus. Höhere Konzentrationen führen zu einer deutlichen Hemmung (siehe Abbildung 3.12).

Im Gegensatz zu den anderen beiden untersuchten Enzymen wirkt sich eine Temperaturerhöhung negativ auf die Enzymaktivität der THD aus (siehe Abbildung 3.12). Optimale Aktivitäten wurden bei Raumtemperatur (22 °C) erzielt.

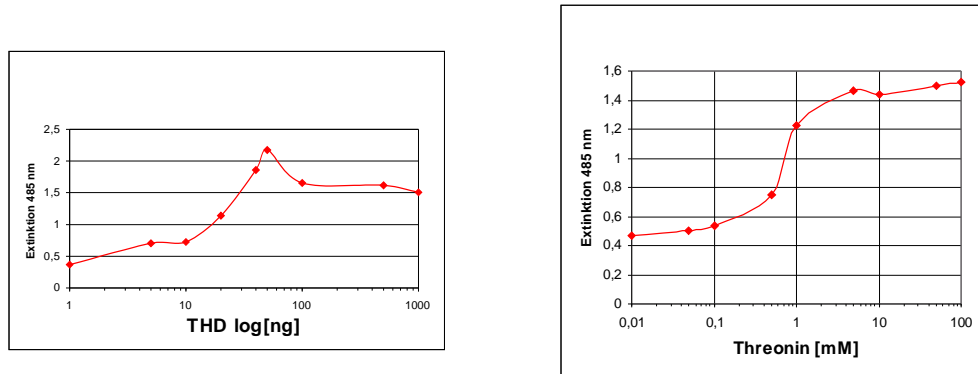


Abbildung 3.11: Bestimmung der optimalen Enzymmenge im Assay (links) und des  $K_m$ -Wertes von Threonin (rechts). Aufgetragen ist in beiden Graphiken der Logarithmus der Enzymmenge bzw. der Threoninkonzentration gegen die Extinktion.

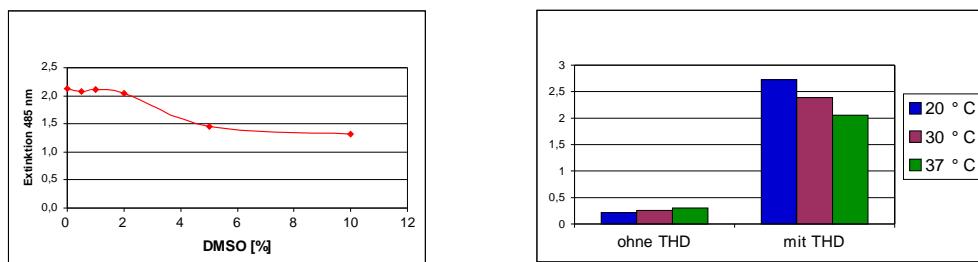


Abbildung 3.12: Bestimmung der DMSO-Toleranz der THD (links) und Messung der Temperaturabhängigkeit des Enzyms (rechts).

Die THD gehört zu den Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen. Schon niedrige Konzentrationen von Pyridoxalphosphat wirken aktivitätssteigernd. Allerdings zeigt die Abbildung 3.13 auch, daß man die Konzentration nicht zu hoch setzen darf. Die Eigenfärbung des Pyridoxalphosphates verfälscht sonst die Extinktion in dem kolorimetrischen Assay.

Zur Optimierung des Assays wurden verschiedene pH-Werte in verschiedenen Puffersystemen getestet. Das Optimum liegt bei der THD bei pH 9 (siehe 3.13).

Da die Threonindehydratase in die Biosynthese von Isoleucin involviert ist, wurde getestet, ob sich das Enzym durch diese Aminosäure hemmen läßt. Das Ergebnis der Messung zeigt die Abbildung 3.14. Geringe Konzentrationen von Valin wirken aktivierend auf die THD, eine Konzentrationserhöhung bringt eine Hemmung mit sich. Da in der Biosynthese von Isoleucin und Valin bis auf die

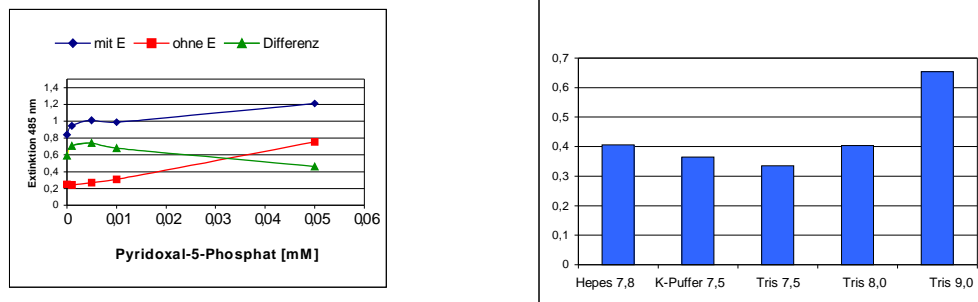


Abbildung 3.13: THD-Aktivität in Abhängigkeit von der Pyridoxalkonzentration (links) und von verschiedenen pH-Werten (rechts).

THS die gleichen Enzyme eine Rolle spielen, wurde auch der Einfluß von Valin getestet. Auch hier kommt es zu einer Hemmung der THS (siehe Abbildung 3.14).

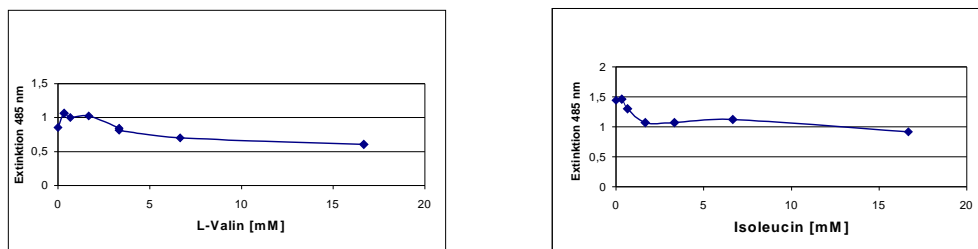


Abbildung 3.14: Einfluß der Aminosäuren Valin (links) und Isoleucin (rechts) auf die Aktivität der THD.

### 3.4 Die Phylogenie der Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel

Von den 90 beschriebenen Enzymen aus dem pflanzlichen Biosyntheseweg der Aminosäuren (siehe Kapitel 1.2) konnte für insgesamt 74 Enzyme ein phylogenetischer Baum berechnet werden. Die Bäume wurden berechnet, um herauszufinden, mit welchen Sequenzen die pflanzlichen Enzyme aus *Arabidopsis* am engsten verwandt sind. Dazu wird grob zwischen eubakteriellen, archaebakteriellen und cyanobakteriellen Sequenzen unterschieden. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Die Sequenzen, die nicht eindeutig zuzuordnen waren, haben ein + in der letzten Spalte. Die Enzyme sind in der gleichen Reihen-

folge nach Stoffwechselwegen sortiert wie in der Einleitung dieser Arbeit. Einzelne Enzyme sind durch eine horizontale Linie in der Tabelle getrennt. Bifunktionelle Enzyme und Enzyme, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, stehen zusammen in einem Feld der Tabelle. Alle Bäume dieser Analyse sind im Anhang der Arbeit abgebildet und unter der in der Tabelle angegebenen Nummer zu finden.

Tabelle 3.1: Phylogenetische Herkunft der Gene aus dem Aminosäurestoffwechsel von *Arabidopsis*. **eubakt**: eubakteriell, **arch**: archaebakteriell, **cyan**: cyanobakteriell, **ne**: nicht eindeutig

Nr.	EC	Enzym	eubakt	arch	cyan	ne
<b>Glutamat-Glutamin</b>						
1	6.3.1.2	Glutaminsynthetase	+			
2	1.4.1.3	Glutamatdehydrogenase (NAD(P)H)				+
3	1.4.1.4	Glutamatdehydrogenase (NADPH)	+			
4	1.4.1.14	Glutamatsynthase (NADH)	+			
5	1.4.7.1	Glutamatsynthase (Ferredoxin)			+	
<b>Prolin</b>						
6	2.7.2.11	$\gamma$ -Glutamatinase	+			
7	1.2.1.41	Glutamatsemialdehydreduktase			+	
8	1.5.1.2	Pyrroline-5-carboxylatreduktase	+			
9	2.6.1.13	$\delta$ -Ornithin-Aminotransferase	+			
<b>Arginin</b>						
10	2.7.2.8	N-Acetylglutamatinase			+	
11	1.2.1.38	N-Acetylglutamatsemialdehydreduktase	+			
12	2.6.1.11	Acetylornithin-Aminotransferase	+			
13	2.3.1.35	Ornithinacetyltransferase			+	
14	6.3.5.5	Carbamoylphosphatsynthase, große UE			+	
15	6.3.5.5	Carbamoylphosphatsynthase, kleine UE			+	
16	2.1.3.3	Ornithincarbamoyltransferase	+			
17	6.3.4.5	Argininosuccinatsynthase	+			
18	4.3.2.1	Argininosuccinatlase	+			
<b>Histidin</b>						
19	2.7.6.1	Ribosepyrophosphokinase			+	
20	2.4.2.17	ATP-phosphoribosyltransferase	+			
21	3.6.1.31	Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrol.	+			
22	3.5.4.19	Phosphoribosyl-ATP-Cyclohydrolase	+			
23	5.3.1.16	BBM-II-Isomerase	+			
24	2.4.2.-	Glutamin-Amidotransferase				+
25	—	Cyclase	+			
26	4.2.1.19	Imidazolglycerolphosphatdehydratase			+	
27	2.6.1.9	Histidinolphosphat-Aminotransferase		+		
28	1.1.1.23	Histidindehydrogenase	+			

Nr.	EC	Enzym	eubakt	arch	cyan	ne
		<b>Aspartat und Asparagin</b>				
29	2.6.1.1	Aspartat-Aminotransferase	+			
30	6.3.5.4	Asparaginsynthase	+			
31	3.5.1.1.	Asparaginase	+			
		<b>Threonin</b>				
32	2.7.2.4	Aspartatkinase (monofunktionell)	+			
33	2.7.2.4	Aspartatkinase	+			
	1.1.1.3	Homoserindehydrogenase	+			
34	1.2.1.11	Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase			+	
35	2.7.1.39	Homoserinkinase		+		
36	4.2.99.2	Threoninsynthase		+		
		<b>Methionin</b>				
37	4.2.99.9	Cystathionin- $\gamma$ -Synthase		+		
38	4.4.1.8	Cystathionin- $\beta$ -Lyase	+			
39	2.1.1.14	Methioninsynthase	+			
		<b>Lysin</b>				
40	4.2.1.52	Dihydrodipicolinat-Synthase	+			
41	1.3.1.26	Dihydrodipicolinatreductase			+	
42	5.1.1.7	Diaminopimelat-Epimerase			+	
43	4.1.1.20	Diaminopimelat-Decarboxylase		+		
		<b>Isoleucin und Valin</b>				
44	4.2.1.16	Threonindehydratase			+	
45	4.1.3.18	Acetolactatsynthase, große UE	+			
46	4.1.3.18	Acetolactatsynthase, kleine UE			+	
47	1.1.1.86	Acetohydroxyacidisomero-reductase				+
48	4.2.1.9	Dihydroxyaciddehydratase	+			
49	2.6.1.42	Branched-chain-Aminotransferase	+			
		<b>Leucin</b>				
50	4.1.3.12	Isopropylmalat-Synthase			+	
51	4.2.1.33	Isopropylmalatisomerase, große UE				+
52	4.2.1.33	Isopropylmalatisomerase, kleine UE				+
53	1.1.1.85	Isopropylmalatdehydrogenase		+	+	
		<b>Alanin</b>				
54	2.6.1.2	Alanin-Aminotransferase				+
		<b>Serin und Glycin</b>				
55	1.1.1.95	Phosphoglycerat-Dehydrogenase	+			
56	2.6.1.52	Phosphoserin-Aminotransferase	+			
57	3.1.3.3	Phosphoserinphosphatase		+		
58	—	Glycinderboxylase-Kompl., H-Protein	+			
59	1.4.4.2	Glycinderboxylase-Kompl., P-Protein			+	
60	1.8.1.4	Glycinderboxylase-Kompl., L-Protein	+			
61	2.1.2.10	Glycinderboxylase-Kompl., T-Protein	+			
62	2.1.2.1	Serinhydroxymethyltransferase	+			
		<b>Cystein</b>				
63	2.3.1.30	Serinacetyltransferase	+			
64	4.2.99.8	Acetylserin-(thiol)-lyase	+			

Nr.	EC	Enzym	eubakt	arch	cyan	ne
		<b>Shikimatweg</b>				
65	4.1.2.15	DHAP-Synthase	+			
66	4.6.1.3	Dehydroquinsynthase	+			
67	1.1.1.25	Shikimatdehydrogenase				+
68	4.2.1.10	Dehydroquinsatdehydratase		+		
69	2.7.1.71	Shikimatskinase			+	
70	2.5.1.19	EPSP-Synthase	+			
71	4.6.1.4	Chorismatsynthase			+	
		<b>Tryptophan</b>				
72	4.1.3.27	Anthranilatsynthase, $\alpha$ -UE	+			
73	4.1.3.27	Anthranilatsynthase, $\beta$ -UE			+	
74	2.4.2.18	Anthranilatphosphoribosyltransferase				+
75	5.3.1.24	Phosphoribosylanthranilatisomerase	+			
76	4.1.1.48	Indolglycerolphosphat-Synthase			+	
77	4.2.1.20	Tryptophansynthase, $\alpha$ -UE			+	
78	4.2.1.20	Tryptophansynthase, $\beta$ -UE (1 und 2)		+		
79	4.2.1.20	Tryptophansynthase, $\beta$ -UE			+	
		<b>Tyrosin und Phenylalanin</b>				
80	5.4.99.5	Chorismatmutase				+
81	5.4.99.5	Chorismatmut./Prephenatdehydrat.				+
82	5.4.99.5	Chorismatmut./Prephenatdehydrog.				+
83	2.6.1.5	Tyrosin-Aminotransferase				+

# 4

## Diskussion

### 4.1 Etablierung der HTS-Assays

#### 4.1.1 Die N-Acetylglutamatkinase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste pflanzliche N-Acetylglutamatkinase kloniert und ihre Funktion durch eine Expression in einem heterologem Expressionssystem gezeigt. Bis jetzt ist nur das Fragment einer Sequenz aus *Oryza sativa* von Dupont [Cahoon et al., 2001] patentiert und die Sequenz aus *Arabidopsis* im Rahmen des Genomprojektes bekannt geworden.

Die N-Acetylglutamatkinase katalysiert den zweiten Schritt in der Arginin-Biosynthese (siehe Abbildung 1.4) und phosphoryliert N-Acetylglutamat zu N-Acetylglutamatphosphat. Erste Hinweise für das Vorhandensein von N-Acetylglutamat in der Argininbiosynthese von Pflanzen kamen von [Morris and Thompson, 1977]. Später wurde das Enzym aus *Pisum sativum* über eine Gelfiltration aufgereinigt und charakterisiert [McKay and Shargool, 1981]. Dabei wurde postuliert, daß die NAGK in seiner aktiven Form als heteromeres Dimer aus zwei Untereinheiten (53 kDa und 43 kDa vorliegt). Das Enzym wurde in *E.coli* [Parsot et al., 1988, Gil et al., 1999], *Pseudomonas aeruginosa* [Haas and Leisinger, 1975], *Chlamydomonas reinhardtii* [Denes, 1970] und in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* [Boonchird et al., 1991], *Schizosaccharomyces pombe* [Huffel et al., 1992]) untersucht. In allen Organismen hat man nur eine Untereinheit des Enzyms gefunden, die in *Pseudomonas* und *E.coli* ein Homodimer ausbildet. Sollte in Pflanzen tatsächlich eine zweite Untereinheit vorliegen, so kann diese nicht für die Aktivität oder die Regulierung durch Arginin essentiell sein, da in dieser Arbeit beides für das klonierte Enzym gezeigt wurde.

Für das klonierte Enzym aus *Arabidopsis* wurde für das Substrat ein  $K_m$ -Wert von 7 mM bestimmt (siehe Abbildung 3.3). Dieser Wert stimmt in etwa mit dem

zweiten  $K_m$ -Wert aus *Pisum sativum* überein [McKay and Shargool, 1981]. Der beobachtete erste  $K_m$ -Wert in der Untersuchung der NAGK aus *Pisum* konnte nicht bestätigt werden. Auch der  $K_m$ -Wert für den Cofaktor ATP liegt mit 1 mM in dem Größenbereich von 1,7 mM ATP bei *Pisum sativum*.

Da die NAGK in der Biosynthese von Arginin eine Rolle spielt, wurde überprüft, ob sie sich durch das Endprodukt in dem Stoffwechsel hemmen läßt. Die Feedback-Hemmung durch das Endprodukt wird häufig in Stoffwechselwegen beobachtet und soll verhindern, daß mehr Endprodukt entsteht als wirklich benötigt wird. Das Ergebnis der Hemmung ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Ab einer Konzentration von 1 mM Arginin kommt es zu einer Hemmung des Enzyms, die sich mit zunehmender Konzentration noch verstärkt. Dies Ergebnis entspricht der beobachteten Hemmung der NAGK bei 1 mM Arginin in *Beta vulgaris* [Morris and Thompson, 1977]. Die Hemmung der NAGK wurde auch schon in Cyanobakterien und anderen photosynthetischen Eubakterien nachgewiesen [Hoare and Hoare, 1966]. In *E. coli* wird die N-Acetylglutamatkinase nicht durch Arginin gehemmt. Dort findet die Regulierung des Stoffwechsels durch die Hemmung des ersten Enzyms der Argininbiosynthese statt (N-Acetylglutamatsynthase) [Udaka, 1966].

Es konnte erfolgreich ein HTS-fähiger Assay für die N-Acetylglutamatkinase entwickelt werden. Bei einer Ausbeute von 40 mg aufgereinigtem Enzym aus einem Liter Expressionskultur und 200 ng Enzym pro Kavität im Assay, ist der Assay ohne großen Aufwand durchführbar. Pro 100.000 Testsubstanzen sind 30 mg Enzym notwendig (entspricht 500 ml Expressionskultur).

Der Assay ist auf nur wenige Pipettierschritte optimiert worden und auf eine relativ kurze Inkubationszeit von einer Stunde. Durch die Zugabe von BSA und Ethylenglykol ist das Enzym auch über eine längere Zeit in den Lösungen für den Assay aktiv. In einem Vorstest wurde der Z-Faktor des Assays kurz nach dem Zusammengeben der Enzym- und Substratlösungen und nach 24 Stunden bestimmt. Der Z-Faktor sinkt dabei von 0,80 auf 0,78 ab. Damit ist der Assay stabil und liegt in dem gewünschten Messbereich, der eine zuverlässige Aussage über den hemmenden Einfluß von Testsubstanzen zuläßt [Zhang et al., 1999] (siehe 2.14.4). Ein erster HTS-Lauf wurde bereits erfolgreich durchgeführt.

#### 4.1.2 Die Homoserinkinase

Die Homoserinkinase (HSK) ist in Pflanzen an der Biosynthese von Threonin, Methionin und Isoleucin beteiligt (siehe Abbildung 1.8). Sie katalysiert die Phosphorylierung von Homoserin zu Homoserinphosphat. Das Homoserinphosphat ist



allerdings nur in Pflanzen das Ausgangsprodukt für die drei genannten Aminosäuren. In Eubakterien und Hefe zweigt die Synthese von Methionin schon vorher beim Homoserin ab [Aubert et al., 1998].

Das Enzym aus *Arabidopsis* ist kernkodiert und trägt ein N-terminales Transitpeptid, um den Transport in den Plastiden zu ermöglichen. Die Länge und die Primärstruktur dieser Transitpeptide ist kaum konserviert [Bruce, 2000]. Das Signalpeptid bindet an den Importapparat des Plastiden an der äußeren Membran (*Toc*). Von dort aus wird das Protein über den Importapparat an der inneren Membran (*Tic*) unter Abspaltung des Transitpeptids in die Plastide transportiert [Chen and Schnell, 1999]. In seiner aktiven Form in der Plastide hat das Enzym kein Signalpeptid mehr. Daher sollte getestet werden, ob es einen Aktivitätsunterschied zwischen der Homoserinkinase mit und ohne Transitpeptid gibt. In der vorliegenden Arbeit wurde die HSK mit und ohne Transitpeptid kloniert und exprimiert. Es ergab sich ein erheblicher Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Konstrukten. Die Aktivität der HSK mit Transitpeptid liegt bei 1 U/mg, ohne Transitpeptid bei 8 U/mg. Der Literaturwert für die HSK mit Transitpeptid liegt bei 3 U/mg Protein für das Enzym mit Transitpeptid [Lee and Leustek, 1999b]. Allerdings wurde dabei der NADH-Assay [Burr et al., 1976] zur Aktivitätsbestimmung verwendet. Daher sind die Angaben nicht direkt miteinander vergleichbar. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum das Signalpeptid hemmend auf die Aktivität wirkt. Am naheliegendsten sind Veränderungen in der Faltung des Proteins, die das aktive Zentrum der HSK stören.

Da die HSK in dem Stoffwechselweg der Aminosäuren Methionin, Isoleucin und Threonin eine Rolle spielt, wurde der Einfluß dieser Aminosäuren auf das Enzym bestimmt. In *E. coli* wird die HSK von Methionin gehemmt [Huo and Viola, 1996]. Keine der drei Aminosäuren hat bis zu einer Konzentration von 17 mM jedoch einen hemmenden Einfluß auf die Aktivität der HSK aus *Arabidopsis*. Die HSK ist für die Synthese von drei Aminosäuren essentiell. Würde sie durch eine der drei Aminosäuren gehemmt werden, so würden dann auch die beiden anderen Biosynthesen nicht ablaufen können. Werden an derartigen Verzweigungspunkten die Enzyme durch ihr Endprodukt gehemmt, so gibt es dort meistens mehrere Isoenzyme, die von unterschiedlichen Endprodukten gehemmt werden. Ein Beispiel dafür sind die drei Isoenzyme der DAHPS im Shikimatweg (Phenylalanin-sensitiv, Tyrosin-sensitiv und Tryptophan-sensitiv, siehe 4.2.5). In *Arabidopsis* wurden jedoch bislang keine Isoenzyme der Homoserinkinase gefunden und daher wurde auch nicht erwartet, daß eine der drei Aminosäuren die Aktivität hemmen.

Für die Homoserinkinase wurde neben dem gekoppelten Assay ein Lumineszenz-Assay etabliert und für das Hochdurchsatzscreening optimiert. Dieser Assay ist ATP-abhängig und kann daher für die Aktivitätsbestimmung aller Kinasen ver-

wendet werden. Ebenso wie die Homoserinkinase wird auch die Luciferase nicht durch niedrige Konzentrationen von DMSO gehemmt. Die Stabilität des Assays konnte durch Zugabe einer ausreichenden Menge von BSA erzielt werden. Die Ausbeute an aufgereinigtem Enzym ist mit 5 mg/l Expressionskultur nicht ganz so gut wie bei der NAGK. Es werden pro Kavität 100 ng im HTS benötigt, so daß pro 100.000 Testsubstanzen 2 l Kultur aufgearbeitet werden müssen. Da sich das Enzym längere Zeit bei -80 °C lagern läßt, ist dies jedoch kein Problem.

Die Inkubationszeit des Assays beträgt nur 45 min, so daß innerhalb kurzer Zeit sehr viele Substanzen getestet werden können. In einem Vortest lag der Z-Faktor nach 0 h Lagerung der Lösungen bei 0,8 und nach 24h bei 0,75. Dies zeigt die Stabilität des Assays an, die sich in einem ersten HTS-Lauf bestätigt hat.

### 4.1.3 Die Threoninsynthase

Die Threoninsynthase (THS) ist das Schlüsselenzym der Threoninsynthese in Pflanzen und im Plastiden lokalisiert [Wallsgrave et al., 1983]. Das Enzym wurde in Eubakterien (*E. coli* [Cassart et al., 1981, Farrington et al., 1993], *Bacillus subtilis* [Skarstedt and Greer, 1973]), Pilzen (*Neurospora* [Flavin and Slaughter, 1960]) und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* [Laber et al., 1999], *Solanum tuberosum* [Casazza et al., 2000]) charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die THS aus *Arabidopsis* erfolgreich exprimiert. Ein HTS-Assay konnte jedoch nicht etabliert werden, da das Substrat der THS, Homoserinphosphat, nicht käuflich zu erwerben ist. Für einen Aktivitätstest von diesem Enzym muß in anschließenden Versuchen das Substrat enzymatisch oder aber chemisch synthetisiert werden.

### 4.1.4 Die Threonindehydratase

Die Threonindehydratase (THD) ist das Schlüsselenzym der Isoleucinsynthese in Pflanzen und katalysiert die Umwandlung von Threonin in  $\alpha$ -Oxobutyrat (siehe Abbildung 1.9). Das Enzym wurde aus Spinat [Sharma and Mazumder, 1970] und pflanzlichen Zellkulturen (*Paul's Scarlets Rose* [Dougall, 1970] aufgereinigt und aus *Lycopersicum esculentum* [Samach et al., 1991] und *Arabidopsis* [Mourad et al., 2000] kloniert.

Auch die THD ist kernkodiert und im Plastiden lokalisiert [Wallsgrave et al., 1983]. Daher wurden auch für die Expression dieses Enzyms zwei Konstrukte bearbeitet, eines mit und eines ohne Transitpeptid. Aus Gründen, die schon in Abschnitt 4.1.2 beschrieben worden sind, wurde erwartet, daß die Expression ohne Transitpeptid zu einer höheren Enzymaktivität führen würde. Die Threonindehy-

dratase zeigt jedoch ohne Transitpeptid eine wesentliche geringere Aktivität, die bei 0,3 U/mg Protein liegt, während bei der Expression des Enzyms mit Transitpeptid eine Aktivität von 7 U/mg gemessen wurde. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß das Transitpeptid kürzer ist als angenommen. Vielleicht wurden einige funktionell oder strukturell wichtige Aminosäuren bei der Klonierung ohne Transitpeptid entfernt, die für die Aktivität des Enzyms entscheidend sind. In einer aktuellen Arbeit von Wessel et al. [2000] über die Expression der THD aus *Arabidopsis* wurden nur 46 Aminosäuren am N-Terminus entfernt und das Enzym in dieser kurzen Form exprimiert. Als Ergebnis erhielt man ein sehr aktives Enzym. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß das Transitpeptid kürzer ist als in der vorliegenden Arbeit angenommen.

In *E. coli* [Shizuta et al., 1973] und in Hefe [Holzer et al., 1963] wird die THD durch die Aminosäure Isoleucin inhibiert. Dies wurde auch bei Pflanzen beobachtet [Sharma and Mazumder, 1970, Strauss et al., 1985] und in der vorliegenden Arbeit anhand des Enzyms aus *Arabidopsis* bestätigt. Es handelt sich hierbei um eine Endprodukt-Hemmung, die verhindert, daß zuviel an Isoleucin synthetisiert wird. Die THD wird durch geringe Konzentrationen Valin aktiviert. Die Biosynthese von Valin wird von den gleichen Enzymen katalysiert, die auch für die Isoleucinsynthese benötigt werden. Die Aktivierung durch geringe Konzentrationen Valin deutet auf eine gemeinsame Regulation des Stoffwechselwegs hin. Das erste gemeinsame Enzym der Isoleucin/Valin-synthese, die Acetolactatsynthase, wird auch von beiden Aminosäuren reguliert [Pang and Duggleby, 1999]. Die Aminosäure Valin hat nicht nur eine aktivitätsteigernde Wirkung auf die THD, sondern stabilisiert das Enzym auch. Ohne die Zugabe von Valin hätte die Stabilität des Enzyms nicht für einen HTS-Assay ausgereicht.

Mit Valin im Reaktionsansatz konnte jedoch ein zufriedenstellender HTS-Assay für die THD etabliert und optimiert werden. Da das Temperaturoptimum des Enzyms bei Raumtemperatur liegt und die Reaktionslösungen ebenfalls bei Raumtemperatur stabil sind, kann der Assay ohne aufwendige Temperierung durchgeführt werden. Der Z-Faktor des Assays lag in einem Vortest nach 0 h bei 0,76 und nach 24 h bei 0,85. Diese Werte und ein bereits durchgeführter erster HTS-Lauf bestätigen die Stabilität und gute Durchführbarkeit des Assays. Bei einer Menge von 30 ng aufgereinigtem Enzym pro Kavität sind nur 300 ml Expressionkultur für den Test von 100.000 Substanzen notwendig.

## 4.2 Die Phylogenie der Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel

### 4.2.1 Die Glutamatfamilie

#### Biosynthese von Glutamat und Glutamin

Die **Glutaminsynthetase** (GS, siehe Anhang Abbildung A.1) ist sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten zu finden, wo sie eine wichtige Rolle bei der Stickstoffassimilation und der Biosynthese von Glutamin spielt [Turner and Young, 2000]. Man unterteilt die Glutaminsynthetasen in GSI und GSII. Den Typ I findet man bei den Prokaryoten und den Typ II nur bei Eukaryoten. Es wird für diese beiden Typen ein gemeinsames Vorläufergen postuliert, dessen Genduplikation vor der Trennung der Eukaryoten und Prokaryoten stattfand [Kumada et al., 1993].

In *Arabidopsis* sind 6 Isoenzyme der Glutaminsynthetase in der vorliegenden Arbeit identifiziert worden. Sie bilden eine Genfamilie und erscheinen im phylogenetischen Baum an einem Ast. Eines von ihnen ist eine plastidäre Isoform mit einem N-terminalen Transitpeptid (GS2), alle anderen sind Formen der cytosolischen GS1. Dieses Ergebnis deckt sich mit den phylogenetischen Analysen von Ochs et al. [1999], die eine Phylogenie der pflanzlichen Sequenzen aus *Brassica napus*, *Raphanus sativus* und aus *Arabidopsis* berechneten und ebenfalls eine Genfamilie postulierten sowie mit der Vermutung von Peterman and Godmann [1991], die eine Genfamilie bei *Arabidopsis* vermutet haben.

Die pflanzlichen Sequenzen clustern in dem Baum mit den anderen eukaryotischen Glutaminsynthetasen aus *Drosophila*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces*. Sie alle gehören zur GS II [Garcia-Dominguez et al., 1997]. In direkter Nachbarschaft zu diesem eukaryotischen Ast befindet sich eine Sequenz aus dem  $\alpha$ -Proteobakterium *Mesorhizobium loti*, die ebenfalls zum Typ II gehört. *Mesorhizobium* und weitere Arten der Rhizobien haben als bislang einzige Gruppe Glutaminsynthetase vom Typ GS I und GS II [Turner and Young, 2000]. Alle anderen prokaryotischen und archaeobakteriellen Sequenzen sind auf einem anderen großen Ast in dem Baum zu finden und gehören zur GS I. Eine weitere Ausnahme sind *Synechocystis* und *Deinococcus*. Sie besitzen beide eine GS I und eine GS III. *Clostridium* taucht in diesem Baum nur mit einer GS III am gleichen Ast wie die beiden letztgenannten Spezies auf. Untersuchungen der GS III wurden bis jetzt nur anhand von *Synechocystis* gemacht [Garcia-Dominguez et al., 1997] und in *Pseudoanabaena* sp., in dem nur die GS II gefunden wurde, GS I fehlt [Crespo et al., 1998].

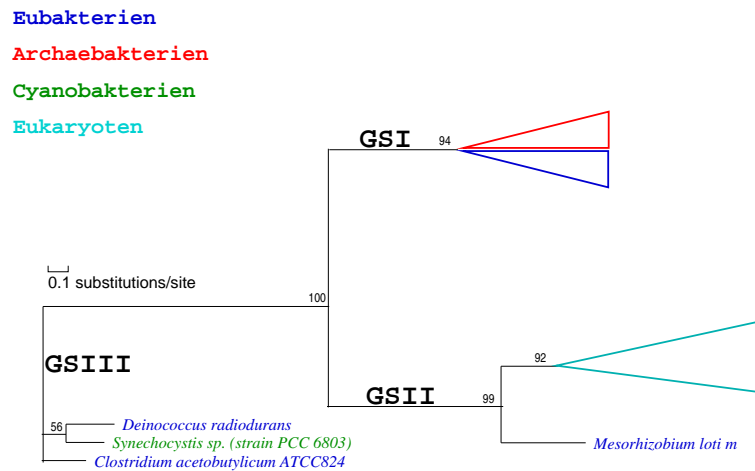


Abbildung 4.1: Schematischer phylogenetischer Baum der Glutaminsynthetase. Die Eubakterien sind blau gekennzeichnet, die Archaeobakterien rot, Cyanobakterien grün und die Eukaryoten türkis.

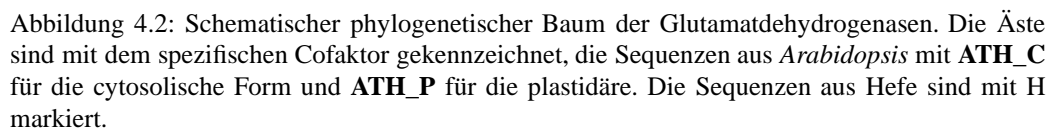
Die Abbildung 4.1 gibt eine schematische Ansicht des berechneten Baumes wieder. Die Topologie spricht dafür, daß die pflanzliche Glutaminsynthetase sowie alle anderen eukaryotischen Gene ihren Ursprung in der GSII von  $\alpha$ -Proteobakterien haben. Bisher sind eubakterielle Sequenzen der GS II nur aus  $\alpha$ -Proteobakterien bekannt [Turner and Young, 2000].

Ein schematischer, phylogenetischer Baum der **Glutamatdehydrogenasen** (GDH, siehe Anhang Abbildung A.2) ist in Abbildung 4.2 gezeigt. Die Äste sind mit der jeweiligen Cofaktorspezifität gekennzeichnet. Es zeigt sich ein sehr inhomogenes Bild, so daß ein mehrmaliger Wechsel der Cofaktor-Spezifität während der Evolution der GDH zu vermuten ist. Aufgrund der Spezifität der GDHs unterscheidet man zwischen monospezifischen NAD- und NADP-abhängigen Enzymen und bispezifischen NAD(P)-abhängigen.

In *Arabidopsis* wurden drei Isoformen der bispezifischen GDH (1.4.1.3) gefunden: GDH1, GDH2, GDH3. Alle drei sind im Baum neben den bispezifischen GDHs der anderen höheren Eukaryoten zu finden. Turano et al. haben diese Isoformen der GDH in *Arabidopsis* untersucht und für sie eine mitochondriale Lokalisation postuliert. Auch andere Studien bei Pflanzen weisen auf eine Genfamilie für die bispezifischen GDHs hin [Pavesi et al., 2000].

Eine zweite GDH aus *Arabidopsis* ist NADP-abhängig (1.4.1.4) und zeigt sich in einem ansonsten eubakteriellen Teil des Baumes, zusammen mit zwei GDHs aus Hefe. Die pflanzliche Sequenz ist im N-terminalen Bereich um etwa 150 Aminosäuren länger als die anderen Sequenzen in diesem Baum. Weder eine Homolo-

Während die NADP-abhängige GDH eindeutig eine enge Verwandtschaft mit den eubakteriellen Homologen aufweist, ist der Ursprung der bispezifischen NAD(P)-abhängigen GDH nicht eindeutig abzuleiten. In diesem Bereich des Baumes (siehe Abbildung 4.2) sind sowohl Archaeobakterien als auch Eubakterien in enger Nachbarschaft zu den eukaryotischen Sequenzen.



Die **Glutamatsynthese** (GOGAT, siehe Anhang Abbildung A.3 und A.4) kommt

in nahezu allen Organismengruppen vor. Die NADPH-abhängige GOGAT findet man bei Eubakterien, die Ferredoxin-abhängige bei Pflanzen und Cyanobakterien und die NADH-abhängige sowohl in photosynthetischen als auch in nicht-photosynthetischen Eukaryoten [Nesbo et al., 2001]. Die GOGAT besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, deren Gene bei Eubakterien getrennt sind und bei Eukaryoten zu einem Gen fusioniert vorliegen, die Ähnlichkeiten zur großen und zur kleinen Untereinheit der Eubakterien zeigen [Temple et al., 1998]. Bei Archaeobakterien ist die Struktur etwas anders. In *Pyrococcus* hat man nur eine GOGAT-homologe Sequenz gefunden, die der kleinen Untereinheit entspricht, jedoch kein Gen für die große Untereinheit. Andererseits weisen die Archaeobakterien *Methanococcus* und *Archaeoglobus* nur ein GOGAT-homologes Gen auf, das der großen Untereinheit entspricht [Dincturk and Knaff, 2000, Nesbo et al., 2001].

In dieser Analyse wurden zwei Ferredoxin-abhängigen GOGATs aus *Arabidopsis* identifiziert, die ein plastidäres Signalpeptid tragen und im phylogenetischen Baum eine enge Verwandtschaft zu der Fd-GOGAT aus *Synechocystis* (GLTS) [Navarro et al., 1995] zeigen. An diesem Ast befinden sich auch die plastidär kodierte Sequenzen aus den Rotalgen *Porphyra* [Reith and Munholland, 1993] und *Cyanidium* [Glöckner et al., 2000]. Von Valentin et al. [1993] wurden in einer anderen Rotalge (*Antithamnion*) die Funktionalität des Gens gezeigt. Diese Befunde sprechen für eine cyanobakterielle Herkunft der pflanzlichen Fd-GOGAT.

Die andere GOGAT aus *Arabidopsis* ist NADH-abhängig. Sie clustert mit den NADH-GOGATs aus *Drosophila* und *Caenorhabditis* und mit der NADP-abhängigen GOGAT aus Hefe. Zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse dieser GOGAT mit den Eubakterien und Archaeobakterien, wurden zwei verschiedene multiple Alignments erstellt und die entsprechenden Bäume dazu berechnet. Grundlage für beide Berechnungen waren die identifizierten Sequenzen aller Fd-abhängigen und eukaryotischen GOGATs. Hinzu kamen bei der ersten Analyse alle verfügbaren großen Untereinheiten und in der zweiten Analyse alle verfügbaren kleinen Untereinheiten. So konnte gezeigt werden, daß die pflanzliche NADH-GOGAT deutlich einen eubakteriellen Ursprung hat und vermutlich durch eine Fusion der ursprünglich eubakteriellen großen und kleinen Untereinheit entstanden ist.

Die Abbildung 4.3 faßt das Ergebnis der phylogenetischen Analyse für die Enzyme in der Biosynthese von Glutamat und Glutamin zusammen.

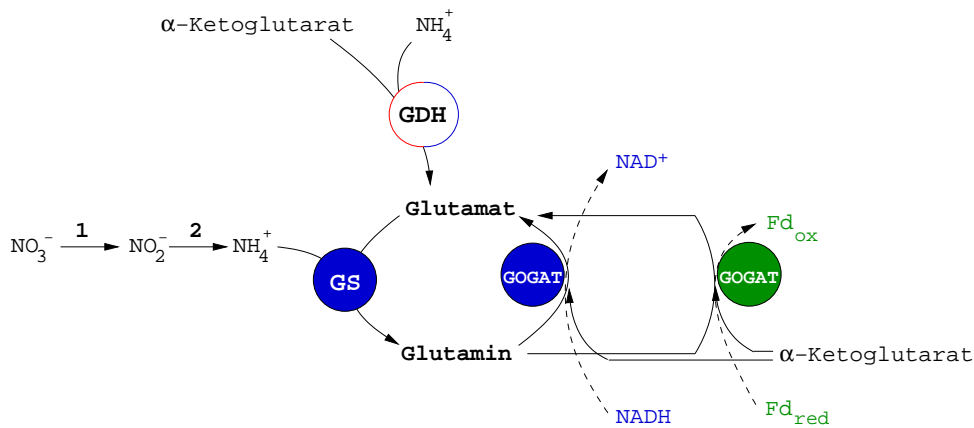


Abbildung 4.3: Phylogenetische Herkunft der Enzyme aus der Glutamat-Glutamin-Synthese. Die Enzyme sind durch farbige Kreise dargestellt. Ein blauer Kreis kennzeichnet eine eubakterielle und grün eine cyanobakterielle Herkunft. Die GDH ist zweifarbig dargestellt, da hier keine eindeutige Aussage zu treffen ist. Von der GOGAT gibt es eine NAD- und eine Ferredoxin-abhängige. **GS**: Glutaminsynthetase, **GDH**: Glutamatdehydrogenase, **GOGAT**: Glutamatsynthase, **Fd**: Ferredoxin

### Biosynthese von Prolin

Aus enzymatischer Sicht ist die Prolinsynthese in Pflanzen vergleichbar mit dem Stoffwechselweg in *E. coli*. Während in *E. coli* und in Hefe jedoch drei verschiedene Gene für die drei Enzyme codieren, sind in Pflanzen und in höheren Eukaryoten die Gene von *proA* und *proB* zu einem Gen fusioniert [Hu et al., 1992]. Das dritte Gen (*proC*) ist so wie in *E. coli* monofunktionell.

Aufgrund der Bispezifität des ersten Enzyms, der  $\Delta$ -Pyrrolin-5-carboxylat-synthetase, mußten zwei phylogenetische Bäume berechnet werden. In dem Baum der **GSA-Reduktase** (Abbildung 4.4, links, *proA* und Anhang Abbildung A.5) stehen alle eukaryotischen Sequenzen mit den zwei Sequenzen aus *Arabidopsis* an einem Ast, was für einen monophyletischen Ursprung dieser Sequenzen spricht. Am gleichen Ast steht die cyanobakterielle Sequenz aus *Synechocystis*, die zu 44 % mit der pflanzlichen Sequenz auf Proteinebene identisch ist. Alle anderen eubakteriellen Sequenzen sind an einem zweiten großen Ast in dem Baum versammelt. Weder für *proA* noch für *proB* existieren archaebakterielle Sequenzen. Vermutlich läuft die Biosynthese bei den Archaeobakterien über das Ornithin zum Prolin, da daß dritte Enzym *proC* in Archaeobakterien gefunden wurde.

Im Baum der  $\gamma$ -**Glutamatkina** (Abbildung 4.4, rechts, *proB* und Anhang Abbildung A.6) sind ebenfalls alle eukaryotischen Sequenzen zusammen an einem gemeinsamen Ast zu finden. Das monofunktionelle Gen aus Hefe steht aller-



dings in dem bakteriellen Teil des Baumes, zusammen mit *Synechocystis*.

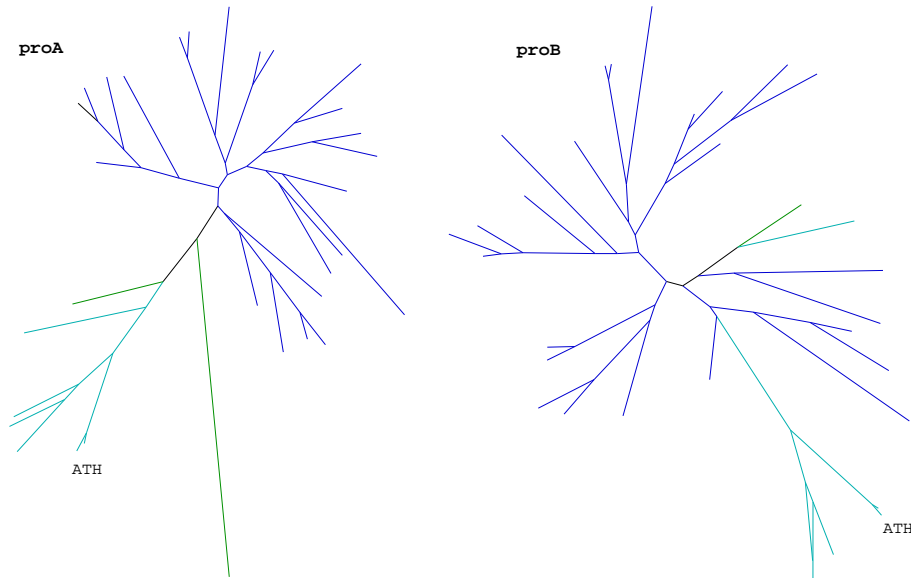


Abbildung 4.4: Phylogenetische Maximum-Likelihood-Bäume der beiden Domänen der  $\Delta$ -Pyrrolin-5-carboxylatsynthetase. Links ist die GSA-Reduktase (*proA*) gezeigt, rechts die  $\gamma$ -Glutamatkinae (*proB*). Eubakterielle Äste sind blau markiert, cyanaobakterielle grün und eukaryotische türkis. Die Sequenzen aus *Arabidopsis* sind mit **ATH** und die aus Hefe mit **H** gekennzeichnet.

Vom dritten Enzym der Prolinsynthese, der  **$\Delta$ -Pyrrolin-5-carboxylatreductase** (P5C-Reductase, *proC*, siehe Anhang Abbildung A.7) ist nur eine Sequenz aus *Arabidopsis* bekannt [Verbruggen et al., 1993]. Auch in diesem Baum sind alle eukaryotischen Gene an einem Ast zu finden. Sie sind untereinander zu ca. 50 % identisch, die Identität mit den benachbarten eubakteriellen Sequenzen (*E. coli*, *Deinococcus* und *Clostridium*) liegt bei etwa 40 %. Im Gegensatz zu den ersten beiden Enzymen der Prolinsynthese sind in diesem Baum auch archaebakterielle Sequenzen zu finden. Sie sind alle klar von den eubakteriellen und eukaryotischen Sequenzen getrennt und bilden einen eigenen Ast im Baum.

Für die  $\delta$ -Ornithin-Aminotransferase ( $\delta$ -OAT, siehe Anhang Abbildung A.8) der Prolinsynthese konnten nur insgesamt 12 Sequenzen gefunden werden: 5 eukaryotische und 5 eubakterielle (2 Proteobakterien, 4 gram-positive Eubakterien). Die eukaryotischen Sequenzen, zu denen auch die pflanzliche Sequenz gehört sind zu etwa 50 % mit den Sequenzen aus den gram-positiven Eubakterien identisch und zu etwa 30 % mit den Proteobakterien.

Die Abbildung 4.5 stellt die evolutionäre Herkunft der Enzyme schematisch im Zusammenhang mit ihrem Platz im Prolinstoffwechsel dar. Die P2CR taucht an dieser Stelle zweimal im Stoffwechsel auf, für die  $\alpha$ -OrnithinAminotransferase wurden keine pflanzlichen Sequenzen gefunden. Daher ist dieses Enzym nicht farbig markiert. Zu sehen ist, daß die Enzyme aus verschiedenen Organismengruppen stammen. Interessanterweise ist im Falle der P5C-Synthetase zu einer Fusion eines eubakteriellen Gens (proB) mit einem cyanobakteriellen Gen (proA) gekommen.

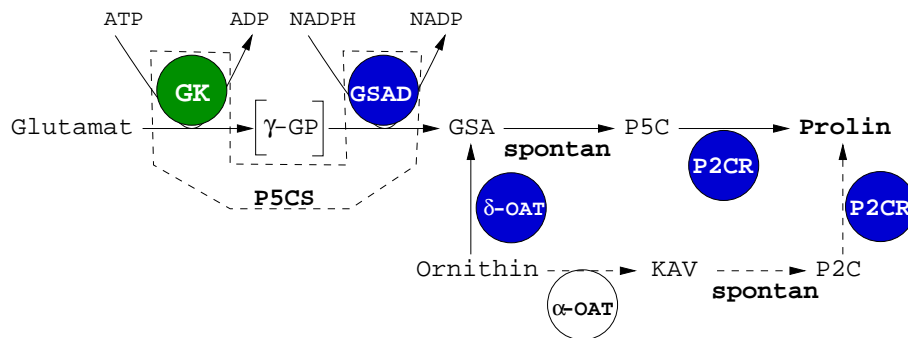


Abbildung 4.5: Die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der pflanzlichen Prolinsynthese. Die gepunkteten Linien zeigen einen Weg an, dessen Enzyme in Pflanzen noch nicht gefunden wurden. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, grüne eine cyanobakterielle. Die Herkunft der  $\alpha$ -Ornithinaminotransferase ist unklar (keine Farbe). **P5CS**: Pyrrolin-5-carboxylat-synthetase, bestehend aus **GK**:  $\gamma$ -Glutamatkinase und  **$\gamma$ -GP**:  $\gamma$ -Glutamatphosphat; **GSAD**: Glutamatsemialdehyd-dehydrogenase; **GSA**: Glutamatsemialdehyd; **P5C**: Pyrrolin-5-carboxylat; **P5CR**: Pyrrolin-5-carboxylat-reduktase;  **$\gamma$ -OAT**:  $\gamma$ -Ornithin-aminotransferase;  **$\alpha$ -OAT**:  $\alpha$ -Ornithin-Aminotransferase; **KAV**:  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -aminovalerat; **P2C**: Pyrrolin-2-carboxylat; **P2CR**: Pyrrolin-2-carboxylat-reduktase.

## Biosynthese von Arginin

Für das erste Enzym der Argininbiosynthese konnte kein pflanzliches Gen identifiziert werden. Deshalb fehlt in der vorliegenden Arbeit eine phylogenetische Analyse der **N-Acetylglutamatsynthetase** (NAGS).

Die **N-Acetylglutamatkinase** (NAGK, siehe Anhang Abbildung A.9), die auch im Rahmen dieser Arbeit aus *Arabidopsis* kloniert wurde, ist eindeutig cyanobakteriell. Sie bildet zusammen mit *Synechocystis* und den plastidär kodierten Genen aus *Porphyra* und *Cyanidium* einen gemeinsamen Ast (siehe Abbildung 4.6). In Abschnitt wurde beschrieben, daß die NAGK sowohl in Cyanobakterien als auch in Pflanzen durch N-Acetylglutamat gehemmt wird, während in *E. coli* die Argininbiosynthese durch das erste Enzym des Stoffwechsels, der NAGS, reguliert

wird. Daher wird postuliert, daß die Regulation durch Arginin des pflanzlichen Enzyms schon im dem cyanobakteriellen Vorläufer enthalten war. Um diese Aussage zu bestätigen, sind genauere Analysen des pflanzlichen und cyanobakteriellen Enzyms notwendig.

Die andere eukaryotische Sequenz in dem phylogenetischen Baum stammt aus *Saccharomyces*. Dabei handelt es sich um eine Genfusion aus der NAGK und dem folgenden Enzym im Stoffwechsel, der NAGPR. Das Gen wird als Polyprotein translatiert, in das Mitochondrium transportiert und dort in zwei eigenständige Enzyme gespalten [Huffel et al., 1992]. Die Hefe ist eng verwandt mit der NAGK aus dem  $\gamma$ -Proteobakterien (41 % Identität). Obwohl das Enzym in Proteobakterien nicht durch Arginin gehemmt wird, zeigt das Enzym aus Hefe und anderen Pilzen doch diese Regulation [Wolf and Weiss, 1980]. Da der phylogenetische Stammbaum zeigt, daß dieses eukaryotische Gen vermutlich aus den Proteobakterien stammt, muß postuliert werden, daß erst im Eukaryoten die Feedback-Regulation durch Arginin entstanden ist.

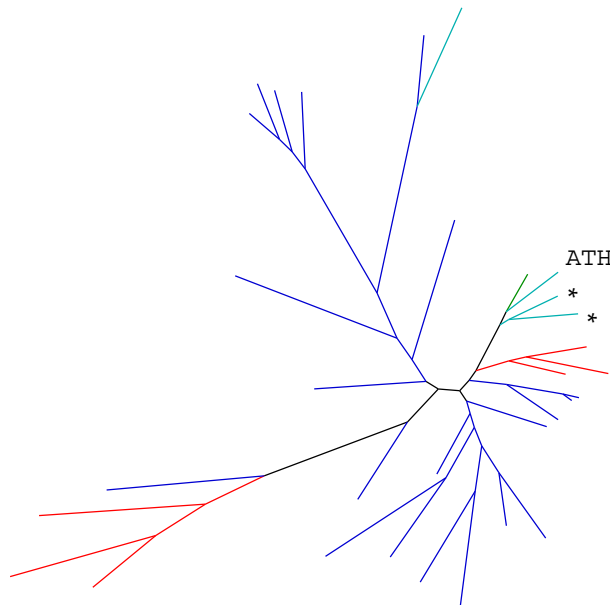


Abbildung 4.6: Phylogenetischer Baum der N-Acetylglutamatkinase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit ATH gekennzeichnet, die beiden plastidären Sequenzen mit einem \*. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Die nächsten beiden Enzyme aus diesem Syntheseweg sind beide eubakterieller Herkunft. Im Fall der **N-Acetylglutamatphosphatreduktase** (NAGPR, siehe Anhang Abbildung A.10) ist die Sequenz aus *Arabidopsis* am ähnlichsten mit

Gram-positiven Eubakterien. Das bifunktionelle Gen aus der Hefe (s.o.) hingegen ist nur zu 27 % identisch mit der pflanzlichen Sequenz, dagegen zu 45 % mit *Xylella*. Im Fall der **Acetylornithin-Aminotransferase** (AOA, siehe Anhang Abbildung A.11) erscheinen die beiden eukaryotischen Gene an einem Ast. Für dieses Gen gibt es dem Anschein nach einen gemeinsamen Vorläufer, der bei den Gram-positiven Eubakterien zu suchen ist.

Der phylogenetische Baum der **Ornithinacetyltransferase** (OAT) (siehe Abbildung 4.7 und Anhang Abbildung A.15) zeigt ein ähnliches Bild wie der Baum der NAGK (siehe Abbildung 4.6). Es gibt hier zwar keine plastidär kodierten Sequenzen, aber das cyanobakterielle Gen aus *Synechocystis* ist in enger Nachbarschaft in dem Baum zu sehen. Auch hier ist direkt neben diesem Ast eine Gruppe von Archaeobakterien angesiedelt. Das Gen aus Hefe ist stärker mit den Eubakterien verwandt als mit *Arabidopsis*.

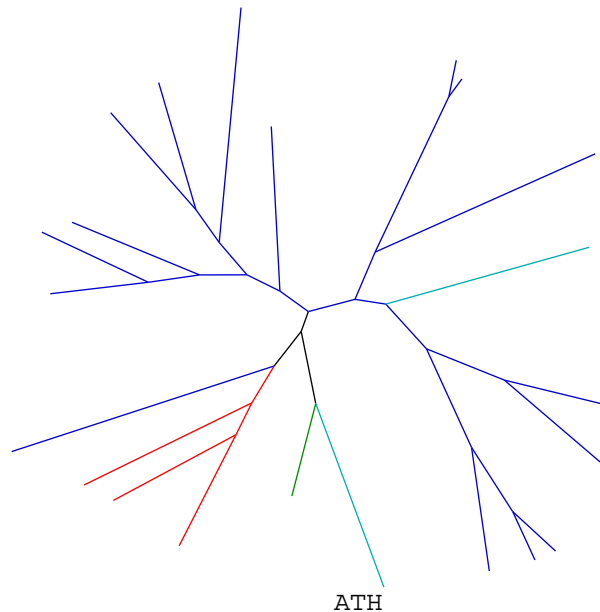


Abbildung 4.7: Phylogenetischer Baum der Ornithinacetyltransferase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit ATH gekennzeichnet. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Die **Carbamoylphosphatsynthetase** (CPSase) besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit (siehe Anhang Abbildung A.13 für die große und Abbildung A.14 für die kleine Untereinheit), die bei *Arabidopsis* von zwei verschiedenen Genen codiert werden, so wie man es auch in Eubakterien vorfindet. In der Abbildung 4.8 sind beide Phylogenien schematisch dargestellt. Es ist deutlich eine

unterschiedliche Herkunft der pflanzlichen Gene und der anderen eukaryotischen Gene zu erkennen. Während für die aus nichtphotosynthetischen Eukaryoten ein archaebakterieller Ursprung postuliert werden kann, stammen beide Untereinheiten der Pflanzen aus Cyanobakterien. Diese Annahme wird durch die beiden plastidär kodierten Sequenzen der kleinen Untereinheit aus *Porphyra* und *Cyanidium* verstärkt. Die einzige andere phylogenetische Untersuchung bei Pflanzen wurde mit den Sequenzen aus *Medicago sativa* durchgeführt. Dort liegen die Untereinheiten in einem Polypeptid vor. Für dieses Fusionsprotein wurde ein eubakterieller Ursprung gezeigt [Zhou et al., 2000]. Die topologische Nähe der *Arabidopsis*-Sequenz zu denen aus Cyanobakterien und Plastiden läßt vermuten, daß eine detaillierte, phylogenetische Analyse eine auch im Stammbaum sichtbare, gemeinsame Abstammung der pflanzlichen und cyanobakteriellen Genen geben wird.

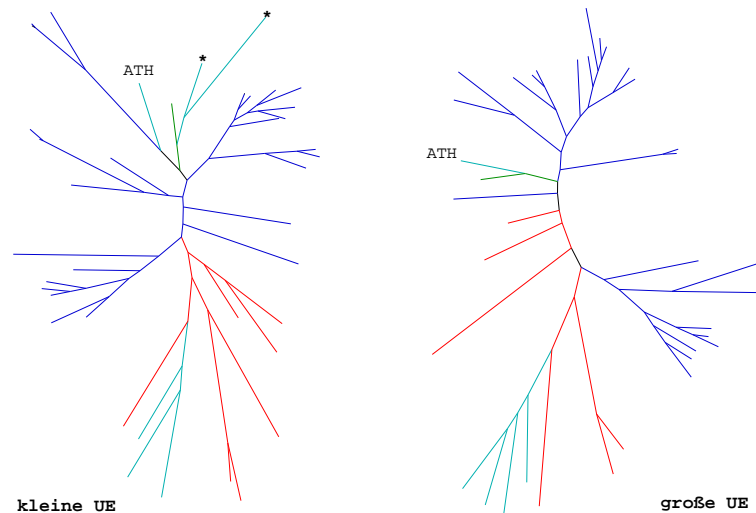


Abbildung 4.8: Phylogenetischer Bäume der großen (linke Seite) und kleinen (rechte Seite) Untereinheiten der Carbamoylphosphatsynthetase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit ATH gekennzeichnet und die beiden plastidären Sequenzen mit einem \*. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Die evolutionäre Herkunft der **Ornithincarbamoyltransferase** (OCT, siehe Anhang Abbildung A.15) ist erst vor kurzem mit Sequenzen aus 44 Spezies untersucht worden [Labedan et al., 2000]. Pflanzliche Sequenzen in der Arbeit von Labedan et al. sind das OCT-Gen aus *Arabidopsis* und aus *Pisum sativum*, welches zu über 70 % mit der Sequenz aus *Arabidopsis* identisch ist. Labedan et al. zeigte für die pflanzlichen Sequenzen die engste Verwandtschaft mit dem Archaeobakterium *Halobacterim salinarium* auf. Eine andere Untersuchung pflanzlicher

Gene aus *Arabidopsis* und *Pisum sativum* brachte diese in die evolutionäre Nähe von Proteobakterien [Quesada et al., 1999]. Die letzterer Befund konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* scheint eubakteriellen Ursprungs zu sein. Die Gene aus den nichtphotosynthetischen Eukaryoten sind nicht klar einzuordnen, der Baum weist in diesem Bereich sowohl archaeobakterielle als auch eubakterielle Spezies auf.

Für letzten beiden Enzyme des Stoffwechsels zeigt sich ein ähnliches Bild. Sowohl die pflanzliche **Argininosuccinatsynthetase** (ASS, siehe Anhang Abbildung A.16) als auch die pflanzliche **Argininosuccinatlase** (ASL, siehe Anhang Abbildung A.17)) sind mit den Eubakterien im phylogenetischen Baum assoziiert. Für beide Bäume gilt auch, daß die anderen eukaryotischen Sequenzen ebenfalls einen eubakteriellen Ursprung zeigen, jedoch an einer anderen Position im Baum.

Die Abbildung 4.9 gibt einen Überblick über die evolutionäre Herkunft der pflanzlichen Enzyme im Argininstoffwechselweg. Von den neun Enzymen konnte für acht eine Phylogenie erstellt werden. Auch in diesem Stoffwechselweg findet man sowohl Gene mit cyanobakteriellem Ursprung als auch Gene mit eubakteriellem Ursprung.

### Biosynthese von Histidin

Die Histidinbiosynthese besteht in Pflanzen aus neun Enzymen, von denen zwei bifunktionell sind, so daß insgesamt 11 enzymatische Schritte für die Synthese von Histidin notwendig sind. Der Syntheseweg in Pflanzen entspricht aus enzymatischer Sicht der Histidinsynthese in *E. coli* [Ohta et al., 2000].

Das erste Enzym, die **Ribosepyrophosphokinase**(RPK, siehe Anhang Abbildung A.18) zeigt einen interessanten Baum (siehe Abbildung 4.10), da in diesem Baum die pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* nicht zusammen mit den anderen eukaryotischen Spezies auftaucht, sondern stattdessen enger mit der cyanobakterielle Sequenz aus *Synechocystis* verwandt ist. Die anderen Eukaryoten (*Caenorhabditis*, *Drosophila*, *Homo sapiens* und *Saccharomyces*) clustern mit eubakteriellen Sequenzen. Die Archaeobakterien sind eindeutige als eigene Gruppe zu erkennen.

In den folgenden Bäume sind keine Sequenzen von höheren Eukaryoten vertreten (*Caenorhabditis*, *Drosophila* und *Homo sapiens*), da Histidin zu den essentiellen Aminosäuren gehört und nur von niederen Eukaryoten (hier *Saccharomyces*), Pflanzen, Eubakterien und Archaeobakterien synthetisiert werden kann. Für das eben genannte Enzym (RPK) sind vermutlich nur deshalb eukaryotische En-

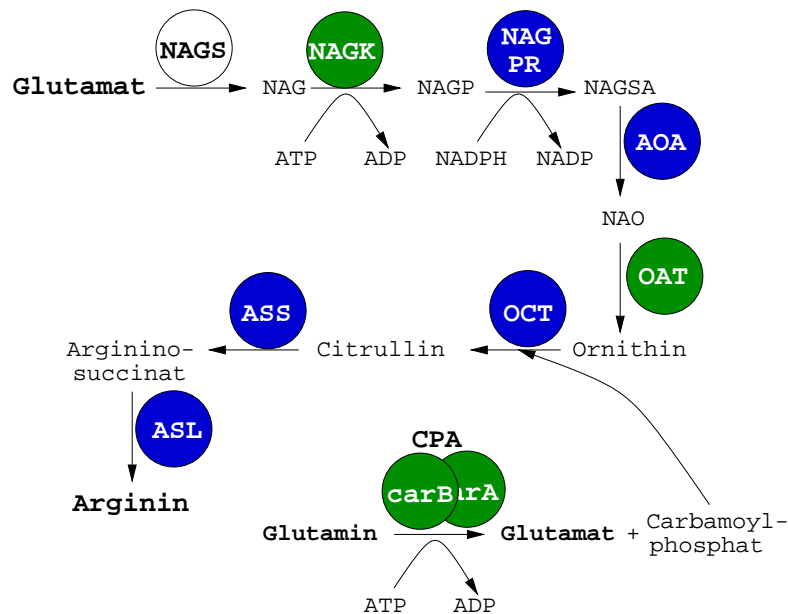


Abbildung 4.9: Die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der pflanzlichen Argininsynthese. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft und grüne eine cyanobakterielle. **NAGS**: N-Acetylglutamatsynthetase, **NAG**: N-Acetylglutamat, **NAGK**: N-Acetylglutamatkinase, **NAGP**: N-Acetylglutamatphosphat, **NAGPR**: N-Acetylglutamatphosphatreduktase, **NAGSA**: N-Acetylglutamatsemialdehyd, **AOA**: Acetylornithin-Aminotransferase, **NAO**: N-Acetylornithin, **OAT**: Ornithin-acetyltransferase, **CPA**: Carbamoylphosphatsynthetase, **OCT**: Ornithin-carbamoyltransferase, **ASS**: Argininosuccinatsynthetase, **ASL**: Argininosuccinatlase.

zyme gefunden worden, da dieses Enzym auch in die Purinbiosynthese involviert ist.

Die Gene der Isoformen der **ATP-Phosphoribosyltransferase** (PRT, siehe Anhang Abbildung A.19) [Ohta et al., 2000] sind miteinander eng verwandt (über 80 % Identität) und liegen in der phylogenetischen Analyse in direkter Nachbarschaft zu den  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien. Die andere eukaryotische Sequenz aus Hefe hingegen zeigt eine größere Ähnlichkeit mit gram-positiven Eubakterien. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Bond and Francklyn [2000] gezeigt.

Die nächsten beiden Schritte werden von einem bifunktionellen Enzym katalysiert. Die Genfusion aus der **Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase und -cyclohydrolase** (siehe Anhang Abbildung A.20 und Abbildung A.21) findet man auch in einigen Eubakterien und Cyanobakterien. Archaeobakterien haben hingegen zwei getrennte Gene. In Hefe besitzt das Gen noch eine dritte Aktivität (die Histidinoldehydrogenase, siehe unten) und ist dadurch sogar trifunktionell.

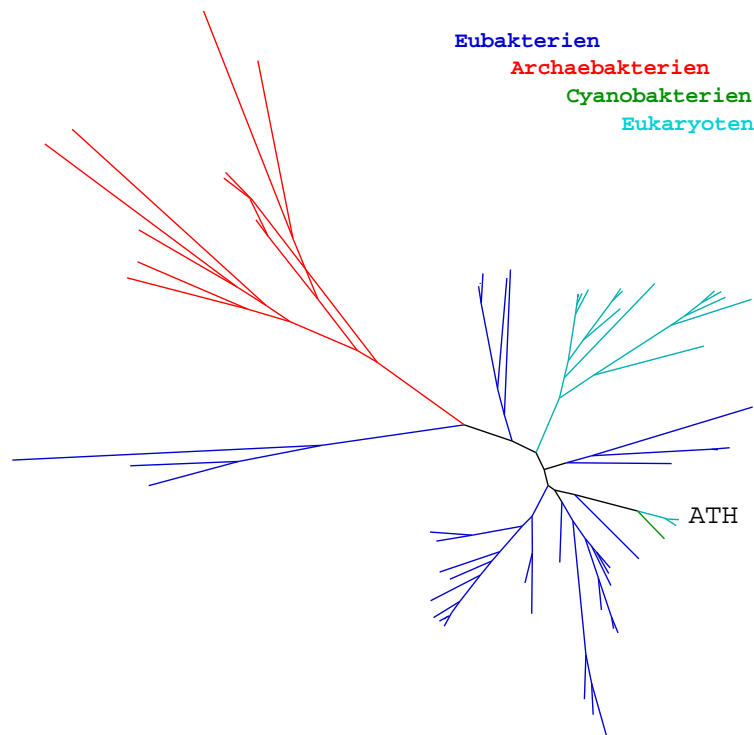


Abbildung 4.10: Phylogenetischer Baum der Ribosepyrophosphokinase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit ATH gekennzeichnet. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Für dieses Enzym wurden zwei Bäume berechnet. In beiden sind die Sequenzen aller bifunktionellen und jeweils die monofunktionellen Enzyme enthalten (siehe Abbildung 4.11).

Die Abbildung 4.11 zeigt für die beide Domänen des bifunktionellen Gens aus *Arabidopsis* eine eubakterielle Herkunft. Während das *his2*-Gen in *Arabidopsis* und Hefe sehr ähnlich ist, so scheinen die *his3*-Gene dieser beiden Eukaryoten einen unterschiedlichen Ursprung zu haben. Beide *his2*-Gene clustern mit Sequenzen aus Gram-positiven Eubakterien. Im rechten Baum ist *Arabidopsis* hingegen in enger Nachbarschaft mit den Proteobakterien zu finden. Hefe wurzelt in der *his3*-Topologie zwischen Gram-positiven Eubakterien und Archaeobakterien. Die Organismengruppen sind in diesem Bereich des Baumes sehr inhomogen verteilt, was ein Hinweis auf lateralen Gentransfer sein könnte.

Die evolutionäre Herkunft der eukaryotischen **BBM-II-Isomerase** (siehe Anhang Abbildung A.22) aus *Saccharomyces* wurde bereits von Fani et al. [1993] untersucht. Bestandteil dieser Analyse war neben der Sequenz aus Hefe, eine ar-



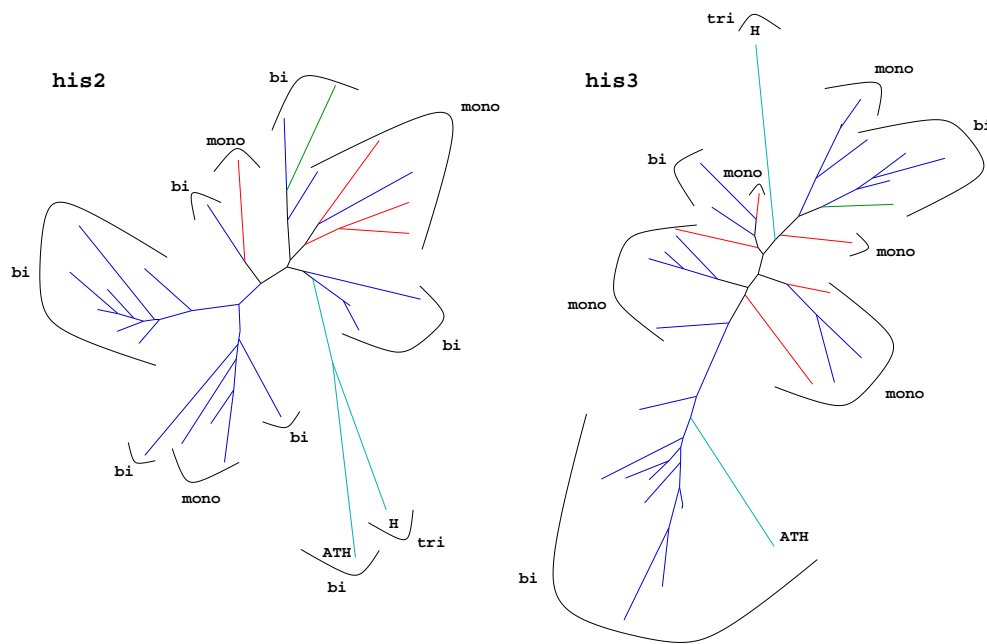


Abbildung 4.11: Phylogenetischer Baum der Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase (**his2**) und -cyclohydrolase (**his3**). Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit ATH gekennzeichnet. Monofunktionelle Gene sind mit mono, bifunktionelle Gene mit bi und das trifunktionelle Gen aus Hefe mit tri markiert. Die Farbcodierung der Organismenreiche entspricht der der vorherigen Abbildungen.

chaebakterielle und 6 eubakterielle Gene. Fani et al. ordneten der eukaryotischen Sequenz einen archaebakteriellen Ursprung zu. Diese Annahme steht im Widerspruch zu dem Ergebnis aus der vorliegenden Arbeit, das in Abbildung 4.12 dargestellt ist. In dem phylogenetischen Baum der BBM-II-Isomerase wird gezeigt, daß die Sequenz aus Hefe der direkte Nachbar der pflanzlichen Sequenzen aus *Arabidopsis* [Fujimori et al., 1998] ist. Die beiden eukaryotischen Gene sind eindeutig enger mit den Eubakterien verwandt als mit den Archaeobakterien (in rot dargestellt).

Für die bifunktionelle **Imidazolglyceratphosphat-Synthase** wurden wieder zwei Bäume (siehe Anhang Abbildung A.23 und Abbildung A.24) berechnet, da das Enzym in Eukaryoten aus zwei Untereinheiten besteht, die in Prokaryoten einzeln codiert werden. In beiden Bäume erscheinen die beiden eukaryotischen Sequenzen eng verwandt. Der Baum für die **Glutaminamidotransferase** (GAT) am N-Terminus des pflanzlichen Enzyms ist nicht eindeutig zu interpretieren, da die eukaryotischen Sequenzen genau zwischen Eubakterien und Archaeobakterien liegen. In einem direkten Sequenzvergleich liegt die Identität bei etwa 46 % mit

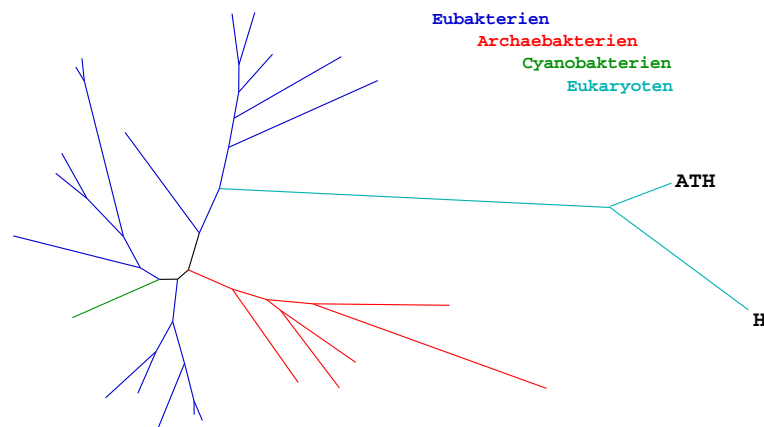


Abbildung 4.12: Phylogenetischer Baum der BBM-II-Isomerase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit **ATH** und die aus Hefe mit **H** gekennzeichnet. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

archaebakteriellen Genen und bei etwa 41 % mit den eubakteriellen. Ein cyanobakterieller Ursprung scheint sehr unwahrscheinlich, da die Sequenz aus *Synechocystis* zusammen mit den plastidär kodierten Genen aus *Cyanidium caldarium* [Glöckner et al., 2000] und *Cyanophora paradoxa* in einem entfernten Bereich in diesem Baum zu finden ist. Die zweite Untereinheit am C-Terminus der Imidazolglyceratphosphat-Synthase, die **Cyclase**, aus *Arabidopsis* und Hefe ist hingegen eine engere Verwandtschaft der eukaryotischen Gene mit den eubakteriellen zu sehen als mit den archaebakteriellen.

Die **Imidazolglyceratphosphat-Dehydratase** (IGPD, siehe Anhang Abbildung A.25) ist in Pflanzen ein monofunktionelles Enzym, von dem in *Arabidopsis* zwei sehr ähnliche Isoenzyme identifiziert werden konnten (über 80 % identisch). Auch in Hefe ist dieses Enzym monofunktionell. In  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien hingegen ist es bifunktionell zusammen mit der Histidinolphosphatase [Tada et al., 1994]. Die phylogentische Herkunft der pflanzlichen IGPD ist cyanobakteriell. Die Identität mit dem Gen aus *Synechocystis* liegt bei 70 %. Das eukaryotische Gen aus Hefe hingegen ist eubakteriellen Ursprungs.

Das nächste Enzym der Histidinbiosynthese ist die **Histidinolphosphat-Aminotransferase** (HPA, siehe Anhang Abbildung A.26). Die Topologie in Abbildung 4.13 zeigt die archaebakterielle Herkunft der pflanzlichen Sequenz. Sie weist 40 % Identität mit dem Gen aus *Archaeoglobus* auf. Bei einem Vergleich mit eubakteriellen Genen ergibt sich nur eine Identität von etwa 32 %.

Für die **Histidinolphosphatphosphatase** (HPP), dem vorletzten Enzym der

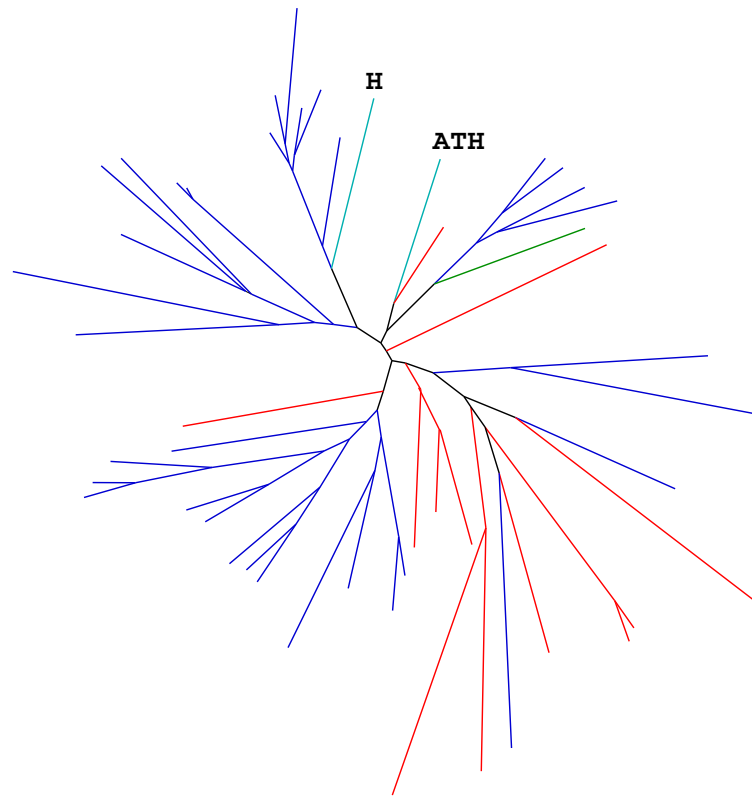


Abbildung 4.13: Phylogenetischer Baum der Histidinolphosphat-Aminotransferase. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist mit **ATH** und die aus Hefe mit **H** gekennzeichnet. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Histidinbiosynthese, gibt es leider noch keine Sequenzdaten aus Pflanzen. Die **Histidinoldehydrogenase** (HDH, siehe Anhang Abbildung A.27) hingegen ist schon aus *Nicotiana tabacum* isoliert worden [Malki et al., 1998], ein homologes Gen wurde in dem Genom von *Arabidopsis* gefunden. In dem phylogenetischen Baum sind in diesem Fall die beiden eukaryotischen Sequenzen sehr ähnlich und haben einen gemeinsamen eubakteriellen Ursprung. Bond and Franklyn [2000] zeigten den eubakteriellen Ursprung der Sequenz aus Hefe in einer umfassenden, phylogenetischen Analyse. Allerdings fehlten in der Analyse Sequenzen aus Pflanzen.

Die Abbildung 4.14 faßt die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse des Histidinstoffwechsels zusammen. Obwohl die Histidinbiosynthese im Plastiden stattfindet und alle kernkodierte Enzyme mit Hilfe eines Transitpeptides in dieses Organell gebracht werden, zeigen nur zwei Gene eine cyanobakterielle Abstammung. Fast alle Gene des cyanobakteriellen Endosymbionten scheinen durch eu-

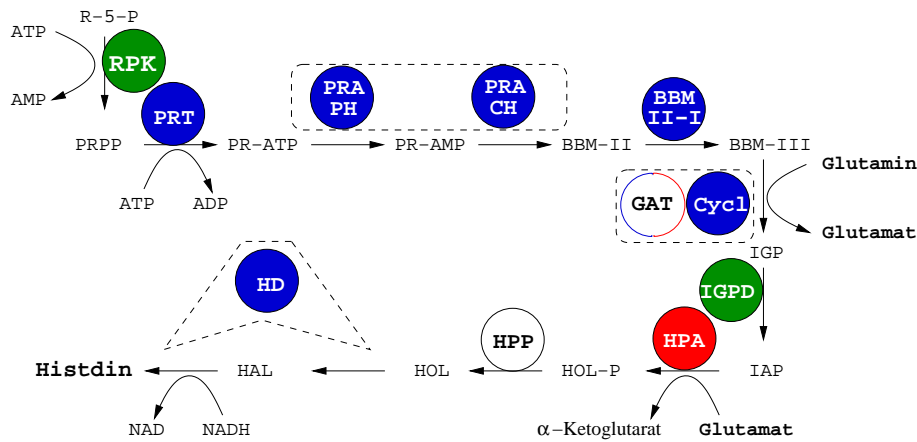


Abbildung 4.14: Die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der pflanzlichen Histidinsynthese. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, grüne eine cyanobakterielle und rote eine archaebakterielle. Die GAT lässt sich nicht eindeutig eu- bzw. archaebakteriell zuordnen und ist deshalb zweifarbig. Aufgrund fehlender pflanzlicher Sequenzen ist die Herkunft der Histidinolphosphatphosphatase unklar (keine Farbe). Die Enzyme PRA-PH und PRA-CH und die GAT und Cyclase liegen in Pflanzen jeweils als ein Polypeptid vor. **R-5-P**: Ribose-5-phosphat, **RPK**: Ribose-pyrophosphokinase, **PRPP**: Phosphoribosylpyrophosphat, **PRT**: Phosphoribosyltransferase, **PR-ATP**: Phosphoribosyl-ATP, **PRA-PH**: Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase, **PR-AMP**: Phosphoribosyl-AMP, **PRA-CH**: Phosphoribosyl-ATP-cyclohydrolase, **BBM-II**: N'-[(5-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid, **BBM-II-I**: BBM-II-Isomerase **BBM-III**: N'-[(5-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid, **GAT**: Glutaminamin, **IGP**: Imidazolglyceratphosphat, **IGPD**: Imidazolglyceratphosphat-Dehydratase, **IAP**: Imidazolacetolphosphat **HPA**: Histidinolphosphat-Aminotransferase, **HOL-P**: Histidinolphosphat, **HPP**: Histidinolphosphat-phosphatase, **HOL**: Histidinol, **HD**: Histidinoldehydrogenase, **HAL**: Histidinal

bakterielle Gene ersetzt worden sein. In dem Fall der Histidinolphosphat-Aminotransferase ist ein archaebakterielles Gen der Vorläufer für das pflanzliche Enzym gewesen.

## 4.2.2 Die Aspartatfamilie

### Biosynthese von Aspartat/Asparagin

Die evolutionäre Herkunft der drei Enzyme zur Synthese von Aspartat und Asparagin gibt ein ziemlich einheitliches Bild ab (siehe Abbildung 4.15). Sowohl die cytosolische, mitochondriale und plastidäre **Aspartat-Aminotransferase** (AspAT, siehe Anhang Abbildung A.28), die Glutamin-abhängige **Asparaginsynthetase** (AS 1, siehe Anhang Abbildung A.29) als auch die **Asparaginase** (ASP, siehe

Anhang Abbildung A.30) sind eng mit den  $\gamma$ -proteobakteriellen Homologen verwandt.

Die Isoformen der AspAT, die in verschiedenen Organellen transportiert werden, sind vermutlich aus mehreren Genduplikationen entstanden, gefolgt von der Akquisition eines plastidären bzw. mitochondrialen Transitpeptids. Die anderen eukaryotischen Sequenzen geben das gleiche Bild ab, so daß man für dieses eukaryotische Gen einen monophyletischen Ursprung postulieren kann. Frühere Analysen zeigten ebenfalls ein sehr ähnliches Bild [Winefield et al., 1995]. Die enge Verwandtschaft der pflanzlichen AS mit *E. coli* zeigen auch schon andere Untersuchungen [Yamagata et al., 1998, Lam et al., 1994].

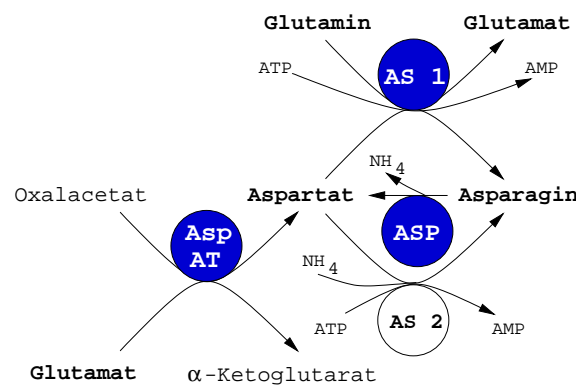


Abbildung 4.15: Die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der pflanzlichen Synthese von Aspartat und Asparagin. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft. Die AS 1 ist nicht farbig gekennzeichnet, da für diese keine phylogenetische Analyse möglich war. **AspAT**: Aspartat-Aminotransferase, **AS 1**: Glutamin-abhängige Asparaginsynthetase, **AS 2**: Ammonium-abhängige Asparaginsynthetase, **ASP**: Asparaginase.

### Biosynthese von Threonin

Die Threoninsynthese wird von der **Aspartatkinase** (AK, siehe Anhang Abbildung A.31) eingeleitet. In Pflanzen findet man sowohl mono- als auch bifunktionelle Aspartatkinasen. Die monofunktionelle AK wird von Lysin gehemmt, die bifunktionelle AK/HDH (Homoserindehydrogenase) von Threonin. An der spezifischen Regulation der Enzyme lassen sich ihre Funktionen dem jeweiligen Stoffwechselweg zuordnen (siehe Abbildung 4.18). Bei *E. coli* findet man neben den beiden genannten AKs noch eine weitere Form, die ebenfalls bifunktionell ist und durch Methionin gehemmt wird. Der phylogenetische Baum der AKs in Abbildung 4.16 zeigt, daß diese Gemeinsamkeiten nicht unabhängig voneinander entstanden sind. Sowohl die bifunktionelle als auch die monofunktionelle AK der

Pflanzen sind am gleichen Ast wiederzufinden wie die entsprechende AKs aus  $\gamma$ -Proteobakterien. Daraus läßt sich ableiten, daß die unterschiedlichen AKs bereits in dieser Form an die Eukaryoten weitergegeben worden sind. Vermutlich ist die methionin-sensitive AK aus *E.coli* ursprünglich threonin-sensitiv gewesen.

Sollte diese Annahme richtig sein, so müßte sich auch bei der Analyse der **Homoserindehydrogenase** (HSD, siehe Anhang Abbildung A.32) das gleiche Bild ergeben. Für die Berechnung der Phylogenie wurden von allen monofunktionellen HSDs und allen HSD-Domänen der bifunktionellen Enzyme Alignment erstellt. Im phylogenetischen Baum zeigt sich tatsächlich die erwartete Verwandtschaft der pflanzlichen HSDs mit den  $\gamma$ -Proteobakterien.

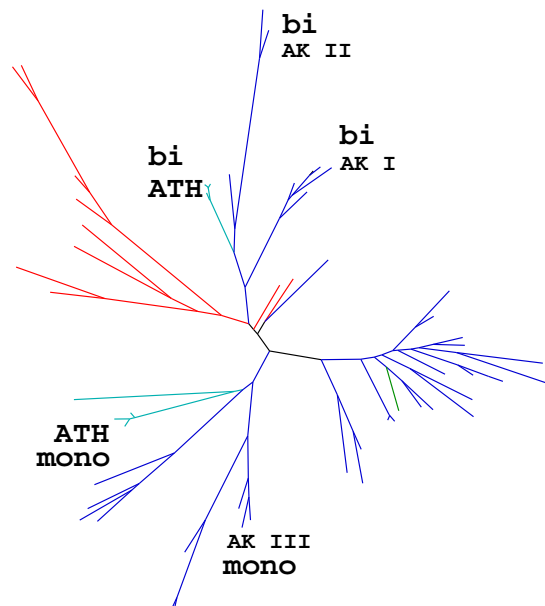


Abbildung 4.16: Phylogenetischer Baum der mono- (mono) und bifunktionellen (bi) Aspartatkinasen. Die Gene aus *Arabidopsis* sind mit ATH gekennzeichnet. Die AKs aus *E. coli* sind folgendermaßen markiert: **AK I**: bifunktionell, threonin-sensitiv, **AK II**: bifunktionell, methionin-sensitiv, **AK III**: monofunktionell, lysin-sensitiv. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.12.

Die **Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase** (ASD, siehe Anhang Abbildung A.33) hingegen zeigt eine cyanobakteriellen Herkunft. Es bildet zusammen mit *Synechocystis* einen gemeinsamen Ast. Literaturstellen, in denen die biochemischen Eigenschaften des pflanzlichen Enzyms untersucht werden, konnten leider nicht gefunden werden. Die Sequenz aus *Arabidopsis* ist im Rahmen des Genomprojektes annotiert worden, aus anderen Pflanzen fehlen die Daten.

Die **Homoserinkinase** (HSK, siehe Anhang Abbildung A.34) gehört zu den Enzymen, die im Rahmen dieser Arbeit aus *Arabidopsis* kloniert und exprimiert wurden. Es ist bislang die einzige bekannte pflanzliche Sequenz einer HSK. In der phylogenetischen Analyse (siehe Abbildung 4.17, links) sind die Eubakterien und die Archaeobakterien klar in zwei Gruppen geteilt. Die pflanzliche Sequenz aus *Arabidopsis* zeigt eine große Ähnlichkeit mit den Homologen aus Archaeobakterien. Auf diese Verwandtschaft wurde auch von Daugherty et al. [2001] hingewiesen, der die erste HSK aus Archaeobakterien (*Methanococcus jannaschii*) exprimierte und funktionell untersuchte. Weder die HSK aus *Methanococcus* noch die pflanzliche aus *Arabidopsis* [Lee and Leustek, 1999b] werden durch hohe Homoserinkonzentrationen inhibiert. Die Aktivität der HSK aus Proteobakterien hingegen verliert bis zu 70 % an Aktivität bei einer Erhöhung der Homoserinkonzentration auf 1 mM [Huo and Viola, 1996]. Die eubakterielle Sequenz am archaeobakteriellen Ast stammt vom  $\gamma$ -Proteobakterium *Xylella fastidiosa*. Vermutlich handelt es sich hier um einen lateralen Gentransfer zwischen Archaeobakterien und Eubakterien, wie er schon in anderen Fällen beobachtet worden ist [Nesbo et al., 2001]. Der hier gezeigte eubakterielle Ursprung der HSK aus Hefe [Mannhaupt et al., 1990] wurde schon früher postuliert [Schultes et al., 1990].

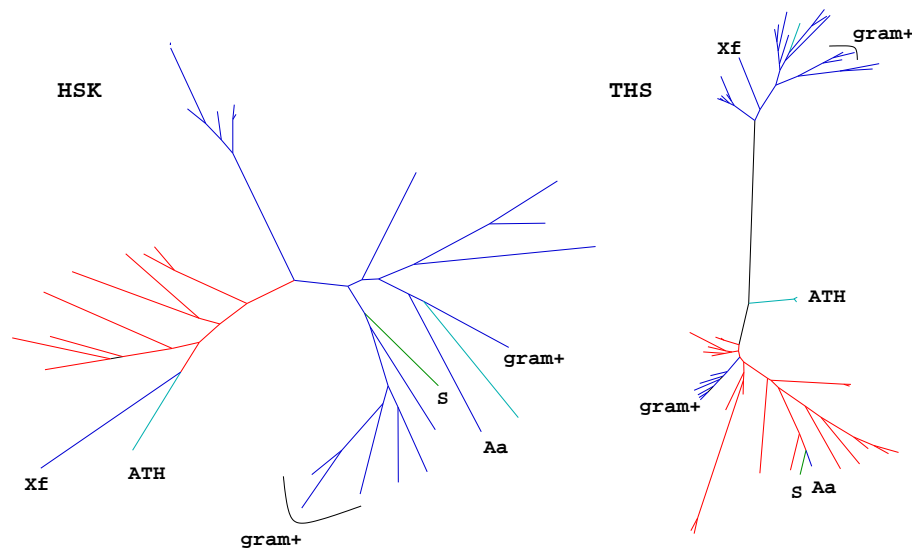


Abbildung 4.17: Phylogenetische Bäume der Homoserinkinase (links) und der Threoninsynthase (rechts). Die Gene aus *Arabidopsis* sind mit ATH gekennzeichnet. **Aa**: *Aquifex aeolicus*, **S**: *Synechocystis*, **Xf**: *Xylella fastidiosa*, **gram+**: Gram-positive Eubakterien. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.12.

Die **Threoninsynthase** (THS, siehe Anhang Abbildung A.35), das letzte En-

zym in der Threoninsynthese, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Auch sie zeigt einen archaebakteriellen Ursprung (siehe Abbildung 4.17, rechts). Ihre Identität mit archaebakteriellen Sequenzen liegt bei etwa 40 %. In diesem Baum fällt die Stellung der gram-positiven Eubakterien besonders auf. Während *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Mycobacterium* unter den Archaeobakterien zu finden sind, stehen *Streptococcus*, *Lactococcus* und *Clostridium* bei den anderen Eubakterien. Vielleicht haben alle Gram-positiven Eubakterien das archaebakterielle Gen einmal besessen und einige haben es sekundär wieder verloren und stattdessen das eubakterielle Gen behalten. Oder aber die Gram-positiven Eubakterien mit den archaebakteriellen Gen haben dieses sekundär erworben und das eubakterielle Gen verloren.

### Biosynthese von Methionin

Ausgehend vom vorletzten Produkt der Threoninsynthese, dem Homoserinphosphat, beginnt die Methioninsynthese im Plastiden mit dem Enzym **Cystathion- $\gamma$ -Synthase** (CGS, siehe Anhang Abbildung A.36). Das Enzym ist zu etwa 40 % mit archaebakteriellen Sequenzen identisch. Das spiegelt auch die phylogenetische Analyse wieder, in der *Arabidopsis* zwischen den Archaeobakterien auftaucht. Die eukaryotische Sequenz aus Hefe hingegen zeigt die größte Identität mit Gram-positiven Eubakterien (etwa 30 %). Die Substratspezifität der CGS in Pflanzen, Eubakterien und Hefe stimmt mit diesem Ergebnis überein. Eubakterien und Pilze verwenden O-succinylhomoserin bzw. O-acetylsuccinylhomoserin als Substrat, Pflanzen dagegen Homoserinphosphat [Ravanel et al., 1995a]. Daher würde man auch erwarten, daß die eukaryotische Sequenz aus Hefe den eubakteriellen Sequenzen ähnlich ist. Über die Substratspezifität bei Archaeobakterien ist jedoch in der Literatur noch nichts berichtet worden. Man würde man bei diesem Ergebnis Homoserinphosphat vermuten. Es kann aber natürlich auch eines von den anderen beiden genannten sein und bei Pflanzen ist es zu einem Wechsel in der Substratspezifität gekommen.

Beide anderen Enzyme aus der Methioninsynthese sind eubakteriellen Ursprungs. Die **Cystathion- $\beta$ -Lyase** (CBL, siehe Anhang Abbildung A.37) zeigt auf Sequenzenebene eine starke Ähnlichkeit mit den Enzym der Gram-positiven Eubakterien, das Hefegen hingegen ähnelt mehr den Homologen aus Proteobakterien. Die **Methioninsynthase** (MS, siehe Anhang Abbildung A.38) zeigt bei beiden Eukaryoten Ähnlichkeiten mit den Gram-positiven Eubakterien.



### Biosynthese von Lysin

Die Lysinbiosynthese ist bei Pflanzen in den Plastiden lokalisiert und biochemisch noch nicht vollständig untersucht worden. Ausgehend vom Aspartatsemialdehyd sind wahrscheinlich sieben Enzyme an der Synthese beteiligt. Von diesen wurden bis jetzt vier auf Sequenzebene identifiziert. Zu diesen vier Genen gibt es keine Homologen aus Hefe, da Hefe Lysin nicht über den DAP-Weg synthetisiert, sondern über den  $\alpha$ -AA-Weg [Nishida et al., 1999].

Das erste Enzym ist die **Dihydrodipicolinatsynthase** (DHDP-S, siehe Anhang Abbildung A.39). Es zeigt im phylogenetischen Baum eine eubakterielle Verwandtschaft. Im Gegensatz dazu clustert die **Dihydrodipicolinatreduktase** (DHDP-R, siehe Anhang Abbildung A.40) mit *Synechocystis* und ist damit einem cyanobakteriellen Ursprung zuzuordnen. Das gleiche gilt für die **Diaminopimelat-Epimerase** (DAP-E, siehe Anhang Abbildung A.41). Auch sie ist eng mit *Synechocystis* verwandt. Die **Diaminopimelat-Decarboxylase** (DAP-D, siehe Anhang Abbildung A.42), das letzte Enzym aus diesem Stoffwechsel, ist archaebakteriell.

Die Abbildung 4.18 gibt einen Überblick über die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der Threonin, Methionin und Lysinbiosynthese bei Pflanzen. Es zeigt sich ein sehr buntes Bild, da sowohl archaebakterielle, als auch cyanobakterielle und eubakterielle Gene ein Vorläufer der heutigen pflanzlichen Genen gewesen sind.

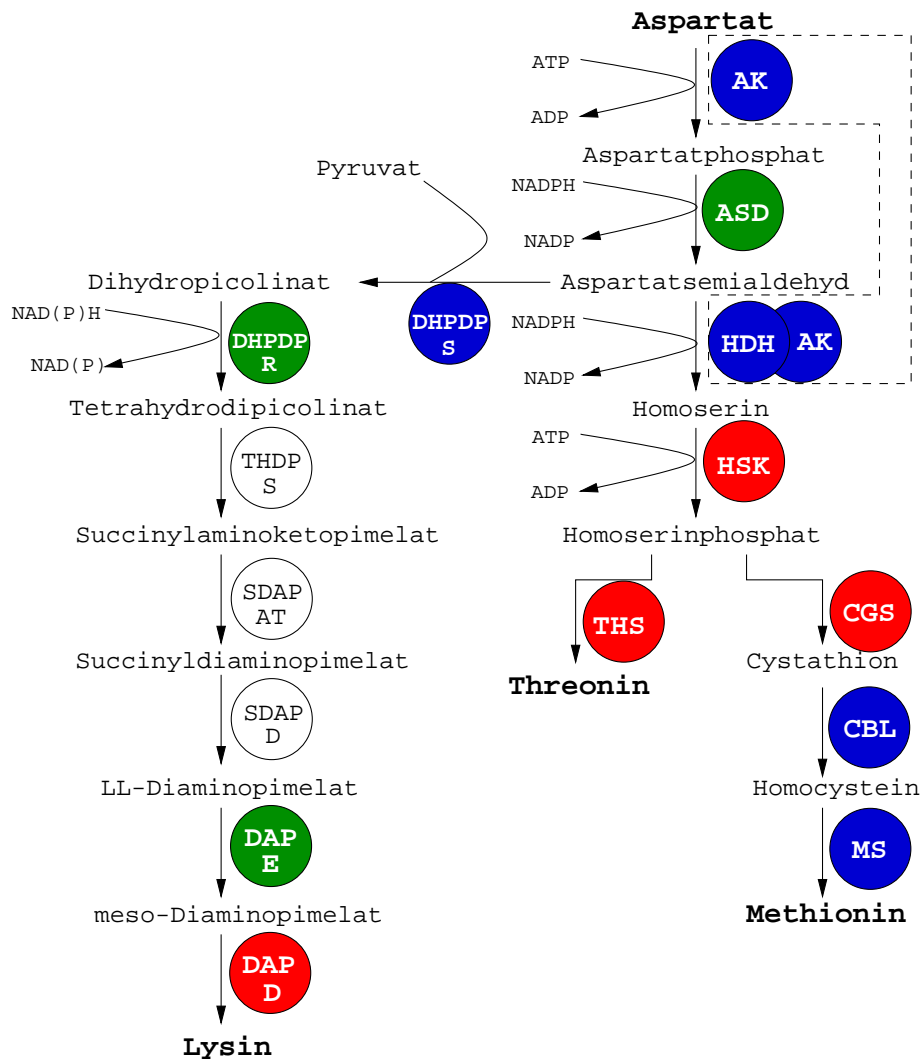


Abbildung 4.18: Die evolutionäre Herkunft der Enzyme in der pflanzlichen Synthese von Threonin, Methionin und Lysin. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, rote eine archaebakterielle und grüne eine cyanobakterielle. Die nicht farbig gekennzeichneten Enzyme konnten aufgrund fehlender Sequenzen nicht untersucht werden. Die Aspartatkinase existiert in einer monofunktionellen und einer bifunktionellen Form mit der Homoserindehydrogenase (siehe gestrichelte Linien). **AK**: Aspartatkinase, **ASD**: Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, **HSD**: Homoserindehydrogenase, **HSK**: Homoserinkinase, **THS**: Threoninsynthase, **CGS**: Cystathion- $\gamma$ -Synthase, **CBL**: Cystathion- $\beta$ -Lyase, **MS**: Methioninsynthase, **DHDP-S**: Dihydrodipicolinatsynthase, **DHDP-R**: Dihydrodipicolinatreduktase, **THDP-S**: Tetrahydrodipicolinat-Succinylase, **SDAP-AT**: Succinyldiaminopimelat-Aminotransferase, **SDAP-D**: Succinyldiaminopimelat-Desuccinylase, **DAP-E**: Diaminopimelat-Epimerase, **DAP-D**: Diaminopimelat-Decarboxylase

### 4.2.3 Die Pyruvatfamilie

#### Biosynthese von Isoleucin und Valin

Die Biosynthese von Isoleucin und Valin werden von den gleichen Enzymen katalysiert, die alle bispezifisch bezogen auf ihr Substrat sind. Nur der einleitende Schritt der Isoleucinbiosynthese kommt in der Valinbiosynthese nicht vor. In der Abbildung 4.20 ist der evolutionären Ursprung der beteiligten Enzyme schematisch dargestellt.

Die Isoleucinbiosynthese beginnt mit der **Threonindehydratase** (THD, siehe Anhang Abbildung A.43), die im Rahmen dieser Arbeit aus *Arabidopsis* kloniert und exprimiert worden ist. Sie ist zu über 50 % mit der Proteinsequenz aus *Synechocystis* identisch. Die eukaryotische Sequenz aus Hefe scheint enger mit den Homologen aus Proteobakterien verwandt zu sein.

Die **Acetolactatsynthase** (ALS) besteht aus einer großen katalytischen (*ilvB*, siehe Anhang Abbildung A.44) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit (*ilvH*, siehe Anhang Abbildung A.45). Beide Untereinheiten sind in den Plastidengenomen der Rotalgen *Porphyra* [Reith and Munholland, 1993] und *Cyanidium* [Glöckner et al., 2000] und in dem Cryptophyten *Guillardia theta* [Douglas and Penny, 1999] codiert. Sie zeigen eine große Ähnlichkeit mit der cyanobakterielle Sequenz aus *Synechocystis*.

In *Arabidopsis* sind beide Untereinheiten in Kerngenom codiert. Die kleine Unterheit in Pflanzen ist doppelt so groß wie die homologe, kleine Untereinheit in Eubakterien. Das pflanzliche Gen wurde vermutlich dupliziert und liegt als eine Fusion vor [Hershey et al., 1999]. In phylogenetischen Baum (siehe Abbildung 4.19, *ilvH*) spricht die Topologie für einen cyanobakteriellen Ursprung des pflanzlichen Enzyms. Anhand der kleinen Untereinheit zeigt sich der Weg des ehemals cyanobakteriellen Gens über die Plastide in das Kerngenom der Pflanzen. Im Gegensatz dazu ist die große Untereinheit enger mit den Eubakterien verwandt. Das cyanobakterielle Gen aus dem Plastiden ist offensichtlich während der Endosymbiose verloren gegangen und durch das eubakterielle Homologe ersetzt worden. In Hefe zeigen beide Untereinheiten eine eubakteriellen Ursprung.

Die enge Verwandtschaft der eukaryotischen Sequenzen für die **Acetohydroxyacidreduktisomerase** (AHRI, siehe Anhang Abbildung A.46) aus *Arabidopsis* und Hefe wurde von Dumas et al. [2001] gezeigt. In der phylogenetischen Analyse der AHRI in der vorliegenden Arbeit zeigt sich das gleiche Ergebnis. Allerdings ist keine Aussage über die evolutionäre Herkunft der Enzyme möglich, da sich der phylogenetische Baum nicht zufriedenstellend auflösen lässt. Die eukaryotischen Sequenzen sind sowohl mit eubakteriellen als auch mit archaebakteriellen Homologen zu etwa 30 % identisch. Um eine Aussage über den evolutionären

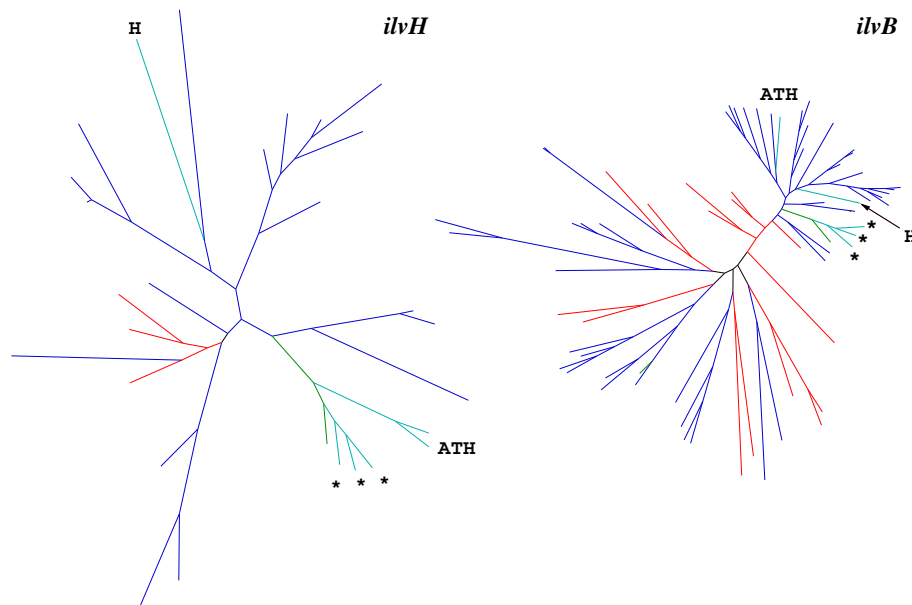


Abbildung 4.19: Phylogenetische Bäume der kleinen (*ilvH*, links) und großen Untereinheit (*ilvB*, rechts) der Acetolactatsynthase. Die Gene aus *Arabidopsis* sind mit **ATH**, aus Hefe mit **H** und die plastidär kodierten aus *Porphyra*, *Guillardia* und *Cyanidium* mit einem \* gekennzeichnet. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Ursprung der eukaryotischen AHRI machen zu können, sind umfassendere phylogenetische Analysen notwendig.

Aufgrund der Analyse der **Dihydroxyacid-Dehydratase** (DHD, siehe Anhang Abbildung A.47) wird auch für dieses Enzym ein gemeinsamer Ursprung der beiden eukaryotischen Sequenzen postuliert. Sie clustern im phylogenetischen Baum zusammen und mit den mit den Homologen aus Gram-positiven Eubakterien.

Insgesamt wurden in *Arabidopsis* sechs **Aminotransferasen** (AT, siehe Anhang Abbildung A.48) für diesen Stoffwechselweg identifiziert, die eine gemeinsame Genfamilie bilden. Sie sind miteinander zwischen 60 % und 80 % identisch. Zu den Homologen aus Gram-positiven Eubakterien zeigen sie die größte Verwandtschaft (etwa 40 %).

### Biosynthese von Leucin

Die Biosynthese von Leucin ist eng mit der Biosynthese von Valin verknüpft (siehe Abbildung 4.20). Die Topologie der phylogenetischen Analyse der **Iso-propylmalat-Synthetase** (IPM-S, siehe Anhang Abbildung A.49) ist ein typisches Beispiel für eine cyanobakterielle Abstammung eines pflanzlichen Enzyms.

In *Arabidopsis* wurden vier Isoenzyme einer Genfamilie identifiziert, die zu etwa 50 % mit dem Enzym aus *Synechocystis* identisch sind. Das Enzym aus Hefe dagegen ist zu 50 % mit Homologen aus Proteobakterien identisch und nur zu 30 % mit *Arabidopsis*.

Die **Isopropylmalat-Isomerase** (IPM-I, siehe Anhang Abbildung A.51 und Abbildung A.50) besteht aus zwei Untereinheiten. Es sind noch keine experimentell bestätigten Sequenzen aus Pflanzen für diese Untereinheiten verfügbar. Die kleine Untereinheit wurde im Rahmen des Genomprojektes in *Arabidopsis* gefunden und die große Untereinheit in dieser Arbeit durch eine Datenbanksuche mit homologen Sequenzen. Beide Proteinsequenzen zeigen eine starke Ähnlichkeit mit Homologen aus Archaeobakterien. Für eine Aussage sind in diesem Fall jedoch weitere pflanzliche Sequenzen bzw. Funktionsanalysen des Enzyms notwendig.

Für die **Isopropylmalat-Dehydrogenase** (IPM-D, siehe Anhang Abbildung A.52) sind in *Arabidopsis* zwei Isoenzymen gefunden worden, die beide zusammen mit *Synechocystis* einen gemeinsamen Ast bilden. Den letzten Schritt in der Leucinsynthese katalysiert die gleiche Aminotransferase wie in der Valin- und Isoleucinbiosynthese.

### Biosynthese von Alanin

Aus verschiedenen Pflanzen wurden **Alanin-Aminotransferasen** (Ala-AT, siehe Anhang Abbildung A.53) charakterisiert [Kikuchi et al., 1999, Muench and Good, 1994, Son and Sugiyama, 1992]. Trotzdem konnte in dieser Arbeit keine Phylogenie für dieses Enzym berechnet werden, da die Aminotransferasen sich insgesamt sehr ähnlich sind und die Sequenzen in den anderen Genomen meist aufgrund fehlender experimenteller Daten nur mit Aminotransferase annotiert worden sind. Es war nicht klar zu erkennen, um welche Art der Aminotransferase es sich handelt.

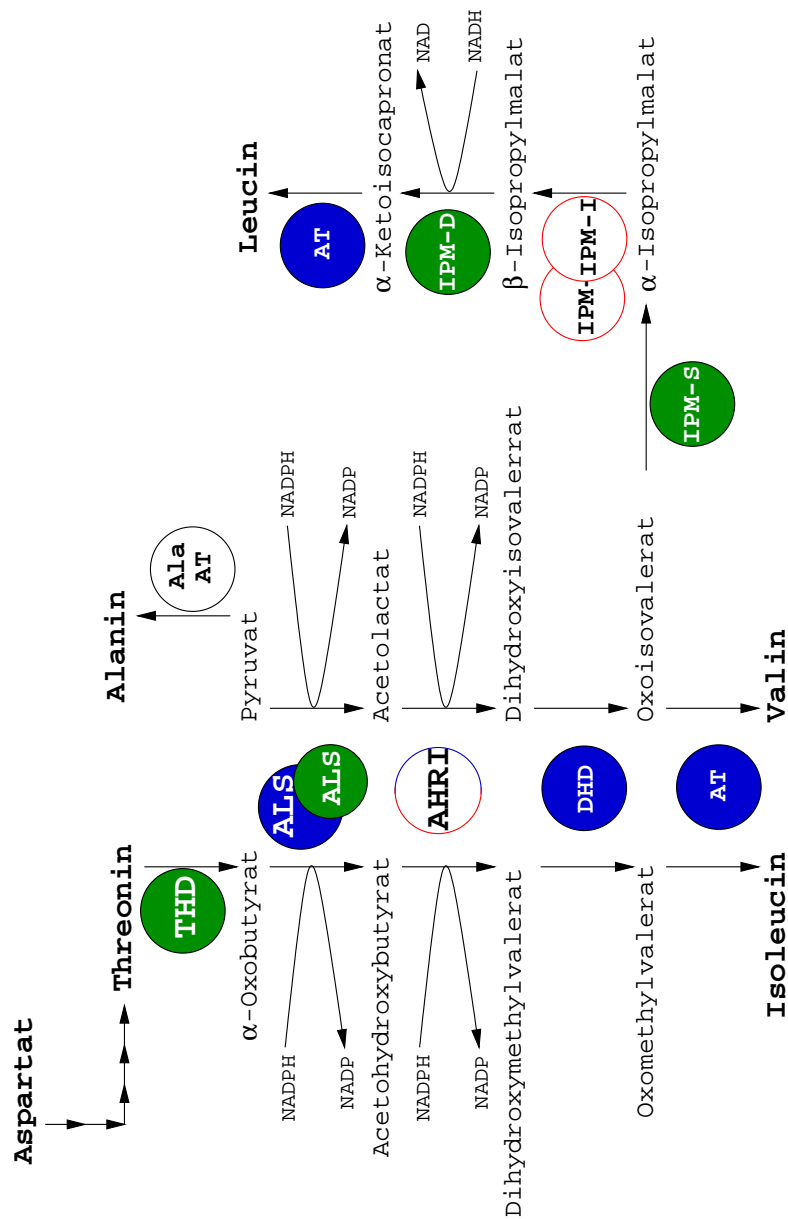


Abbildung 4.20: Phylogenetische Herkunft der Enzyme aus den Biosynthesewegen der Aminosäuren aus der Pyruvatfamilie (Leucin, Valin und Alanin) und von Isoleucin. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, rote eine archaeobakterielle und grüne eine cyanobakterielle. Für die AHR-I ist keine Aussage möglich, die Ähnlichkeiten mit Homologen aus Eubakterien und Archaeobakterien sind gleich. Die Untereinheiten der IPM-I scheinen archaeobakteriell. Sie sind hier trotzdem nicht farbig ausgemalt, weil die pflanzlichen Sequenzen nicht experimentell bestätigt sind. Die Ala-AT konnte aufgrund fehlender homologer Sequenzen nicht analysiert werden. **THD**: Threonindehydratase, **ALS**: Acetolactatsynthase (2 Untereinheiten), **AHR-I**: Acetohydroxyacidreduktisomerase, **DHD**: Dihydroxyacid-Dehydratase, **AT**: Aminotransferase, **IPM-S**: Isopropylmalat-Synthase, **IPM-I**: Isopropylmalat-Isomerase (2 Untereinheiten), **IPM-D**: Isopropylmalat-Dehydrogenase, **Ala-AT**: Alanin-Aminotransferase

## 4.2.4 Die Phosphoglyceratfamilie

### Biosynthese von Glycin und Serin

In Pflanzen wird Serin entweder über den Phosphoglyceratweg im Plastiden synthetisiert oder über den Glykolatweg in der Photorespiration [Ho and Saito, 2001] (siehe Abbildung 4.22).

Die **Phosphoglycerat-Dehydrogenase** (PGDH, siehe Anhang Abbildung A.54) ist aus *Arabidopsis* charakterisiert worden [Ho et al., 1999b]. Ho et al. [1999b] unterteilen die eukaryotischen PGDHs von vier Eukaryoten, zwei  $\gamma$ -Proteobakterien, einem Gram-positiven und *Synechocystis* in zwei Gruppen: Zu einer Gruppe zählen sie die höheren Eukaryoten (Pflanzen, Mensch und Ratte) und zur anderen Gruppe gehört Hefe. In ihrer Analyse bilden die höheren Eukaryoten zusammen mit den Gram-positiven Eubakterien einen Ast im phylogenetischen Baum, während die Hefe bei den Proteobakterien zu finden ist. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine umfassendere Analyse (32 eubakterielle Sequenzen, 8 archaeobakterielle und 8 eukaryotische) bestätigt.

Im Fall der **Phosphoserin-Aminotransferase** (PSAT, siehe Anhang Abbildung A.55) clustern alle eukaryotischen Sequenzen zusammen und zeigen die stärkste Verwandtschaft mit den Gram-positiven Eubakterien. Dies wurde auch bereits von Ho et al. [1998] in einer Analyse mit einem kleineren Datensatz vermutet.

Einen sehr interessanten phylogenetischen Baum (siehe Abbildung 4.21) zeigt die **Phosphoserin-Phosphatase** (PSP, siehe Anhang Abbildung A.56). Aufgrund der Topologie des phylogenetischen Baumes scheinen die Enzyme der höheren Eukaryoten eine archaeobakterielle Herkunft zu haben. Sie sind zwar stark evolviert, erkennbar an dem langen Ast, aber immer noch zu 33 % mit den archaeobakteriellen Sequenzen identisch. Das homologe Enzym aus Hefe wurzelt in dem Baum bei den Homologen aus den Gram-positiven Eubakterien (über 40 % Identität). Damit wird die von Ho et al. [1999a] gezeigte Phylogenie nicht bestätigt. Dort wurden nur je drei Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryoten (Hefe, *Arabidopsis* und Mensch) in die Berechnungen mit einbezogen. Sie zeigten einen monophyletischen Ursprung der eukaryotischen Homologen.

In der Photorespiration sind zwei Enzyme unmittelbar an der Synthese von Serin und Glycin beteiligt: Die **Glycin-Decarboxylase** (GDC) und die **Serinhydroxymethyltransferase** (SHMT). Die GDC ist ein Komplex aus vier Untereinheiten: P-Protein (Glycin-Dehydrogenase, siehe Anhang Abbildung A.58), H-Protein (siehe Anhang Abbildung A.57), T-Protein (Aminomethyltransferase, siehe Anhang Abbildung A.60) und L-Protein (Lipoamid-Dehydrogenase, siehe Anhang

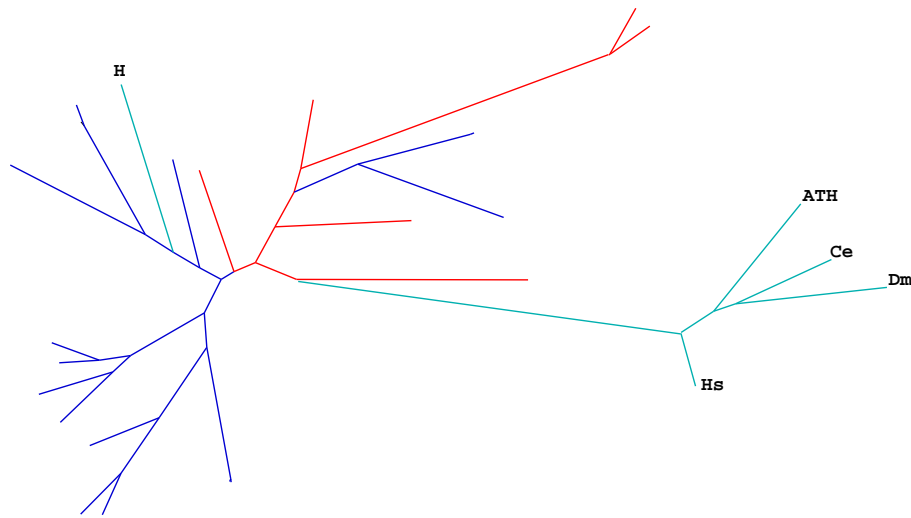


Abbildung 4.21: Phylogenetischer Baum der Phosphoserin-Phosphatase. Das Gen aus *Arabidopsis* ist mit **ATH** gekennzeichnet. **H**: Hefe, **Hs**: *Homo sapiens*, **Dm**: *Drosophila melanogaster*, **Ce**: *Caenorhabditis elegans*. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.1.

Abbildung A.59). Die Synthese der Aminosäuren findet in dem Mitochondrien statt. Daher würde man vermuten, daß die Enzyme eubakteriell sind und aus dem Mitochondriongenom stammen, das ursprünglich ein  $\alpha$ -Proteobakterium war [Gray, 1998]. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, daß das pflanzliche L-Protein im phylogenetischen Baum mit einem  $\alpha$ -Proteobakterium clustert. Auch das T-Protein clustert mit Sequenzen aus  $\alpha$ -Proteobakterien. Das mitochondriale H-Protein zeigt ebenfalls eine eubakterielle Herkunft. Da das P-Protein die stärkste Verwandtschaft zu dem cyanobakteriellen Homologen zeigt, muß man hier einen Austausch des mitochondrialen Proteins mit einem plastidären Homologen postulieren. Für diesen Austausch müßte das P-Protein zunächst aus dem Genom des endosymbiontischen Cyanobakteriums, dem späteren Plastiden, in den Zellkern transportiert worden sein. Nach Akquisition eines mitochondrialen Transitpeptids hat es dann das ursprüngliche P-Protein im Mitochondrion verdrängt. Die SHMT (siehe Anhang Abbildung A.61) hingegen zeigt wieder die erwartete Ähnlichkeit mit  $\alpha$ -Proteobakterien. Von diesem Enzym gibt es eine kleine Genfamilie in *Arabidopsis*, bestehend aus mindestens 5 Isoformen [McClung et al., 2000].



### Biosynthese von Cystein

Die Biosynthese von Cystein wird in Pflanzen von zwei Enzymen katalysiert. Die **Serinacetyltransferase** (SAT, siehe Anhang Abbildung A.62) und die **O-Acetylserin-(thiol)-Lyase** (OAS-TL, siehe Anhang Abbildung A.63) kommen beide in mehreren Isoformen vor und bilden zusammen den oligomeren Cysteinsynthase-Komplex. Die Isoformen sind im Plastiden, im Mitochondrion und im Cytosol lokalisiert. So kann in allen drei Kompartimenten Cystein bereitgestellt werden.

In der phylogenetischen Analyse zeigt sich bei beiden Enzymen, daß die Isoformen je einen gemeinsamen Vorläufer haben und vermutlich durch mehrere Genduplikationen entstanden sind. Vermutlich wurden nach der Genduplikation des Vorläufers unterschiedliche Transitpeptide aquiriert, die den Transport in die Kompartimente gewährleisten. Sowohl für die OAS-TL als auch für die SAT wird ein proteobakterielles Vorläufergen postuliert. In beiden Bäumen zeigen sich die Proteobakterien in enger Verwandtschaft zu der pflanzlichen Genfamilie. In diesem Stoffwechselweg wurden die plastidären Gene des cyanobakteriellen Endosymbionten im Plastiden durch proteobakterielle Homologe ausgetauscht.

Die Abbildung 4.22 faßt den evolutionären Ursprung des Enzyms aus der Phosphoglyceratfamilie zusammen.

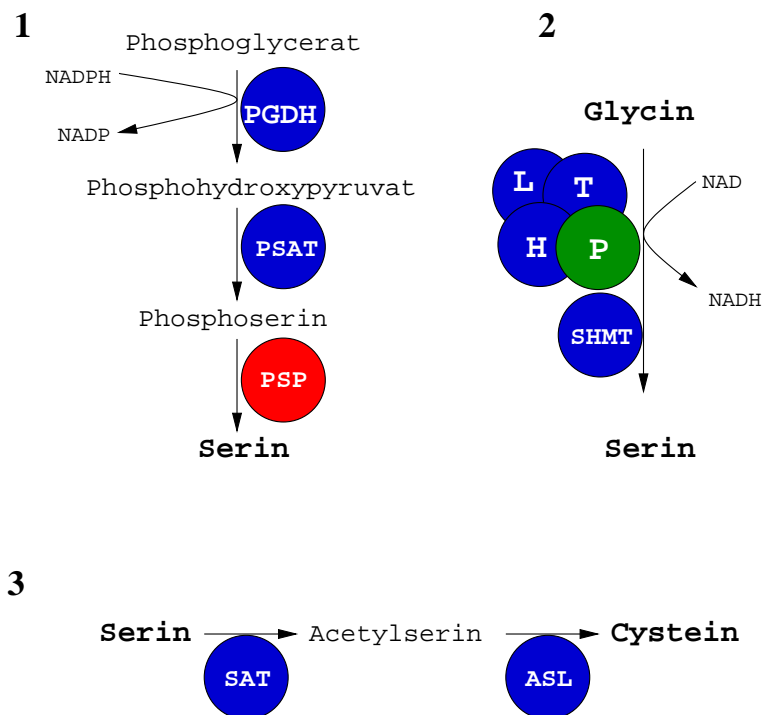


Abbildung 4.22: Evolutionäre Herkunft der Enzyme aus der Biosynthese von Serin, Glycin und Cystein. Gezeigt sind (1) der Phosphoglyceratweg im Plastiden und der Glykolatweg (2) aus der Photorespiration im Mitochondrium. (3) zeigt die Enzyme der Cysteinsynthese. **PGDH**: Phosphoglycerat-Dehydrogenase, **PSAT**: Phosphoserin-Aminotransferase, **PSP**: Phosphoserin-Phosphatase, **GDC**: Glycin-Decarboxylase, **SHMT**: Serinhydroxymethyltransferase, **SAT**: Serinacetyltransferase, **ASL**: O-Acetylserin-(thiol)-Lyase. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, rote eine archaebakterielle und grüne eine cyanobakterielle.

## 4.2.5 Die Phosphoenolpyruvatfamilie

### Shikimatweg

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse der Enzyme aus dem Shikimatweg ist in Abbildung 4.25 dargestellt.

Die **3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase** (DAHPS, siehe Anhang Abbildung A.64) wird in zwei verschiedene Typen eingeteilt. Zur Klasse I werden die kleinen eubakteriellen Formen (etwa 39 kDA) gerechnet, die in *E. coli* in drei verschiedenen Isoformen auftauchen. Je eine ist Phenylalanin-sensitiv (aroG), Tyrosin-sensitiv (aroF) und Tryptophan-sensitiv (aroH). Der Typ II wurde nach der großen DAHPS in Pflanzen benannt (etwa 54 kDA). Ihre Aktivität wird durch keine der drei aromatische Aminosäuren gehemmt [Herrmann, 1995, Herrmann and Weaver, 1999].

Der phylogenetische Baum in Abbildung 4.24 zeigt, wie unterschiedlich sich die beiden DAHPS-Typen in ihrer Primärstruktur sind und daß es sowohl vom Typ I eukaryotische Sequenzen gibt (Hefe) als auch vom Typ II auch eubakterielle Homologe (Proteobakterien und Gram-positive Eubakterien). Die enzymatische Aktivität ist jedoch bei beiden Typen identisch. Die DAHPS vom Typ II aus Pflanzen kann in *E. coli*-Mutanten, deren DAHPS-Gene defekt sind, die eubakterielle DAHPS vom Typ I funktionell ersetzen [Herrmann and Weaver, 1999]. Der phylogenetische Baum zeigt auch, daß die eukaryotische DAHPS aus Hefe zum Typ I gehört, während die eukaryotische aus Pflanzen zum Typ II zu zählen ist. In der Abbildung sind alle blauen Äste Proteobakterien, wenn sie nicht mit **gram+** gekennzeichnet sind. Die Proteobakterien besitzen die beide Typen der DAHPS, Gram-positive Eubakterien sogar noch eine dritte Form, die sonst nur bei Archaeobakterien auftaucht. Diese liegt als Polypeptid vor und enthält zusätzlich die Aktivität der Chorismatmutase, die in der Synthese von Phenylalanin und Tyrosin eine Rolle spielt.

Für die Entstehung der drei Typen der DAHPS gibt es mehrere Möglichkeiten. Man könnte postulieren, daß der gemeinsame Vorläufer der heutigen Archaeobakterien, Eubakterien und Eukaryoten alle drei Typen der DAHPS besaß. In den verschiedenen Organismengruppen gingen dann unterschiedlich Formen verloren. Nur die Gram-positiven Eubakterien enthalten noch alle drei Formen. Das würde bedeuten, daß in den beiden Eukaryoten verschiedene Formen verloren gingen. Eine andere Möglichkeit ist, daß die dritte Form eine archaeobakterielle Form ist und durch einen lateralen Gentransfer auf *Bacillus* übertragen wurde. Da die archaeobakterielle Form eine größere Ähnlichkeit mit der Typ I zeigt, könnte man auch im gemeinsamen Vorläufer die archaeobakterielle Form und Typ II vermuten. Dann wäre der Typ I aus der archaeobakteriellen entstanden und stark evolviert.

AROG_ECOLI	-LPAQVMIDFSHAN-----SSKQFKKQMDVCADVCQIAGGEKA---IIGVMVESH
AROH_ECOLI	-LPEHLVVDFSHGN-----CQKQHRRLQLEVCECICQIIRNGSTA---IAGIMAESFL
AROG_YEAST	--SNGLMIDYSHGN-----SNKDFRNQPKVNDVVCEQIANGENA---ITGVMIESNI
AROF_YEAST	DSQKRIMIDCSHGN-----SNKDFKNQPKVAKCIYDQLTEGENS---LCGVMIESNI
AROF_ECOLI	-LRPSLMVDCSHGN-----SNKDYRRQPAVAESVVAQIKDGNRS---IIGLMIESNI
LACTOBAC	LQNPFIVIDTNHDN-----SGKKYMEQIRIVRQTLVNRNWDQIHKYVRGFMIESYL
AROG_BACSU	--ATRNTLDISAVP-----ILKQETHLPVFVDVTHSTGRRDLLPTAKAALAIGADG
SULFOLOBUS	--STRFTLDIGGMV-----AAKLMTHLPICADPSHPAGKRELVHSLAALAAGAADM
ARATH_1	GQIVTWVCDPMHGNTIKAPCGLKTRAFDSILAEVRAFLDVHEQEGSHAGGIHLEMTGQNV
SINORHIZ	GKKVWVSCDPMHGNTITLNN-YKTRPFERILSEVESFFQIHRAEGSHPGGIHIEMTGNDV
MYCOBAC_TUB	GHQVIWQCDPMHGNTHESSSTGFKTRHFDRIDEVQGFVEVHRALGTHPGGIHVEITGENV

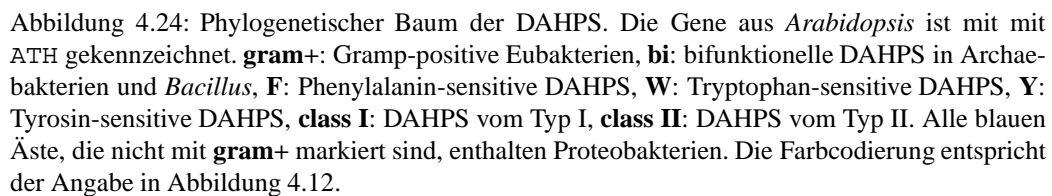
Abbildung 4.23: Ausschnitt aus dem multiplen Alignment der DAHPS. Stellvertretend für den **Typ I** sind Sequenzen aus *E. coli* und Hefe (AROG\_ECOLI, AROH\_ECOLI, AROG\_YEAST, AROF\_YEAST, AROF\_ECOLI) gezeigt und eine Sequenz aus einem Gram-positiven Eubakterium (*Lactobacillus lactis*). Darunter stehen die beiden Sequenzen aus *Bacillus subtilis* und dem Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus*. Die letzten Sequenzen aus *Arabidopsis* (ARATH), einem  $\alpha$ -Proteobakterium (*Sinorhizobium meliloti*) und dem Gram-positiven Eubakterium *Mycobacterium tuberculosis* gehören zum **Typ II**.

Dafür sprechen einige Bereiche im multiplen Alignment. Die Abbildung 4.23 zeigt einen Ausschnitt. Es sind nur ein paar der Sequenzen aus dem phylogenetischen Baum stellvertretend für die drei Typen der DAHPS gezeigt. Die Sequenz des Gram-positiven Eubakteriums *Lactobacillus lactis* könnte man als eine Übergangsform zwischen der archaeobakteriellen Form und Typ ansehen, da in der Sequenz an der gleichen Position eine Insertion auftritt, die auch in der archaeobakteriellen Sequenz zu sehen ist, auch wenn sie sich auf Sequenzebene unterscheiden.

In Pflanzen wurde nicht nur im Plastiden eine DAHPS nachgewiesen, sondern auch im Cytosol [Schmid and Amrhein, 1995]. Zu dieser Isoform der DAHPS fehlen bis jetzt molekulare Studien.

Das nächste Enzym im Chorismatweg ist die **Dehydroquinat-Synthase** (DHS, siehe Anhang Abbildung A.65). Sie ist in fast allen untersuchten Spezies monofunktionell. In Hefe findet man die DHS in dem aroM-Multikomplex, einem Polypeptid, das alle folgenden Enzyme aus dem Shikimatweg außer der Chorismatsynthase enthält [Herrmann and Weaver, 1999]. Das pflanzliche DHS-Enzym zeigt einen eubakteriellen Ursprung.

In Pflanzen werden die folgenden beiden Schritte von der bifunktionellen Shikimat:NADP-Oxidoreduktase katalysiert. Sie enthält sowohl die **Dehydroquinat-Dehydratase** (DHD, siehe Anhang Abbildung A.67) als auch die **Shikimat-Dehydrogenase** (SD, siehe Anhang Abbildung A.66). Die DHD zeigt deutlich eine archaeobakterielle Herkunft im phylogenetischen Baum. Sie gehört weder zum Typ I noch zum Typ II, den man bei Eubakterien gefunden hat [Herrmann and Weaver, 1999]. Für die SD kann nur eine Tendenz im Baum zu den archaebak-



Der evolutionäre Ursprung der **Shikimatkinase** (SK, siehe Anhang Abbildung A.68) dagegen ist eindeutig cyanobakteriell. *Arabidopsis* und *Synechocystis* bilden im phylogenetischen Baum einen gemeinsamen Ast. Für die **5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat-Synthase** (EPSP-Synthase, siehe Anhang Abbildung A.69) muß im Gegensatz dazu wieder eine eubakterielle Herkunft postuliert werden aufgrund der engen Verwandtschaft mit den Homologen aus Proteobakterien.

Das letzte Enzym aus dem Skikimatweg ist die **Chorismatsynthase** (CS, siehe Anhang Abbildung A.70), die ein ähnliches Ergebnis wie die SK zeigt. Der cyanobakterielle Ursprung der CS wurde auch schon in anderen Arbeiten gezeigt

[Macheroux et al., 1999].

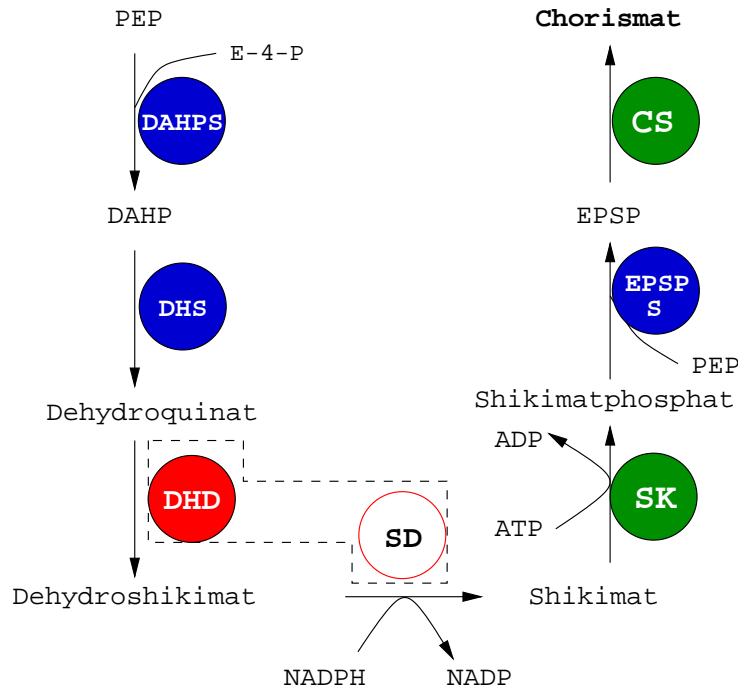


Abbildung 4.25: Phylogenetische Herkunft der Enzyme des Chorismatweges im Zusammenhang mit ihrer Position in diesem Stoffwechsel. Die bifunktionelle Shikimat:NADP-Oxidoreduktase enthält die Enzyme innerhalb der gestrichelten Linien. **PEP**: Phosphoenolpyruvat, **E-4-P**: Erythrose-4-phosphat, **DAHPS**: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate-Synthase vom Typ II, **DHS**: Dehydroquinat-Synthase, **DHD**: Dehydroquinat-Dehydratase, **SD**: Shikimat-Dehydrogenase, **SK**: Shikimatkinaase, **EPSP**: 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat, **EPSP-S**: EPSP-Synthase, **CS**: Chorismatsynthase. Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle Herkunft, rote eine archaebakterielle und grüne eine cyanobakterielle. Die SD konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, es wird jedoch eine archaebakterielle Herkunft vermutet.

### Synthese von Tryptophan

Die Tryptophansynthese wird durch die **Anthranilatsynthase** (AS, siehe Anhang Abbildung A.71 und Abbildung A.72) eingeleitet. Sie besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$  oder Komponente I und  $\beta$  oder Komponente II), die in allen Organismen von verschiedenen Genen codiert werden. Bei einigen findet man die  $\beta$ -Untereinheit als eine Genfusion mit der Phosphoribosylantranilattransferase oder aber mit der Indolglyceratphosphat-Synthase, einem weiteren Enzym aus dem Tryptophanstoffwechsel. Die erste Variante gibt es z. B. in *Thermotoga maritima*, die zweite in *Saccharomyces cerevisiae*. Für die  $\alpha$ -Untereinheit der AS

ergibt sich in der vorliegenden Arbeit eine eubakterielle Herkunft. Alle drei Isoformen zeigen sich an einem Ast zusammen mit einem Gram-positiven Eubakterium. Die vier Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit hingegen sind eng mit *Synechocystis* verwandt. Ihre cyanobakterielle Herkunft wird durch die plastidär kodierten  $\beta$ -Untereinheiten in den Rotalgen *Porphyra* und *Cyanidium* und dem Glaucocystophyten *Cyanophora paradoxa* unterstützt. *Cyanophora* gehört zu den sehr ursprünglichen Algen und enthält noch die Peptidoglukanzellwand des cyanobakteriellen Endosymbionten in den Cyanellen (besondere Plastidenform) [Helmchen et al., 1995]. Anhand des Vorkommens und der Verwandtschaften der  $\beta$ -Untereinheit läßt sich der Weg dieses Gens von der kernkodierten Form in *Arabidopsis* über die plastidär kodierten in den Algen bis zum Ursprung in den heutigen Cyanobakterien zurückverfolgen.

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse der **Phosphoribosylanthranilat-transferase** (PAT, siehe Anhang Abbildung A.73) läßt keine eindeutige Aussage über die phylogenetische Herkunft der pflanzlichen Sequenz zu. Sie bildet zwar einen Ast mit den Homologen aus Archaeobakterien, aber die Äste sind in diesem Teil des Baumes nicht sehr stabil. Auch die andere eukaryotische Sequenz aus Hefe ist in diesem Teil des Baumes zu finden. Es wird für beide eine Tendenz zur archaeobakteriellen Herkunft postuliert.

Sowohl von für die **Phosphoribosylanthranilatisomerase** (PAIS, siehe Anhang Abbildung A.74) als auch für die **Indolglyceratphosphat-Synthase** (IGPS, siehe Anhang Abbildung A.75) sind je zwei Isoformen gefunden worden. Während die PAI im phylogenetischen Baum einen eubakteriellen Ursprung zeigt, ist die IGPS cyanobakteriell.

Das letzte Enzym in diesem Biosyntheseweg ist die **Tryptophan-Synthase** (TSS, siehe Anhang Abbildung A.76 und Abbildung A.77). Ähnlich wie die AS besteht sie aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die bei allen Organismen von zwei Genen codiert werden, nur in Hefe liegen sie in Form einer Genfusion vor [Zalkin and Yanofsky, 1982]. Beide Untereinheiten sind aus *Arabidopsis* charakterisiert worden [Berlyn et al., 1989, Radwanski et al., 1995]. Die beiden Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit sind vermutlich durch eine Duplikation entstanden und gehören einer Genfamilie an. Im phylogenetischen Baum ist wieder eine enge Verwandtschaft mit den plastidär kodierten Genen von *Cyanidium* [Ohta et al., 1994] und *Porphyra* [Reith and Munholland, 1993] und dem Cyanobakterium *Synechocystis* zu sehen.

Bis jetzt wurden nur sehr verwandte Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit aus *Arabidopsis* charakterisiert. In Rahmen des Genomprojektes wurde allerdings eine neue Form der  $\beta$ -Untereinheit gefunden. Im phylogenetischen Baum (siehe Abbildung 4.26) ist zu sehen, daß die bisher bekannten  $\beta$ -Untereinheiten genauso wie die  $\alpha$ -Untereinheit aus dem cyanobakteriellen Endosymbionten stammen. Der neue

Typ der  $\beta$ -Untereinheit zeigt schon im multiplen Alignment für die  $\beta$ -Untereinheit vom Typ II in Archaeobakterien charakteristische Bereiche auf. Dies bestätigt die Phylogenie der Sequenzen

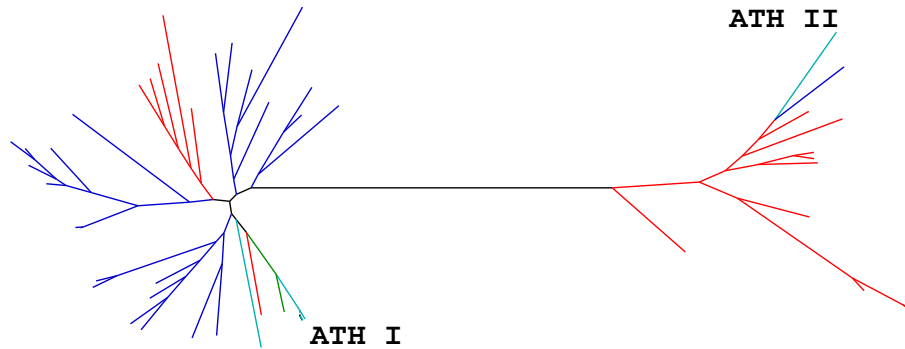


Abbildung 4.26: Phylogenetischer Baum der  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophansynthase. Die cyanobakteriellen Isoformen sind mit ATH I markiert, die neue archaeobakterielle Form mit ATH II. Die Farbcodierung entspricht der Angabe in Abbildung 4.12.

Die  $\beta$ -Untereinheit vom Typ I findet man in Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten (linke Seite des Baumes in der Abbildung 4.26). Tang et al. [1999] bezeichneten die  $\beta$ -Untereinheit der TS als eines der konserviertesten Enzyme in der Tryptophansynthese, da das Enzym aus *Pyrococcus* eine 58 % Identität mit *E. coli* aufweist und 54 % mit Hefe. Allerdings wurde die  $\beta$ -Untereinheit vom Typ II nicht mit in diese Analyse einbezogen. Der Typ II ist fast nur in Archaeobakterien zu finden. Zu diesem Typ gehört auch die neue Form aus *Arabidopsis* sowie eine eubakterielle Sequenz aus *Thermotoga maritima*. Die beiden sind sich sehr ähnlich (Identität von 60 %). Es stellt sich die Frage, ob die Sequenz aus *Arabidopsis* direkt aus einem Archaeobakterium stammt oder aber über einen lateralen Gentransfer das archaeobakterielle Gen aus Archaeobakterien an Eubakterien weitergeben wurde und später im Zuge der Endosymbiose ins Genom der Pflanze transferiert wurde. Dies ist eine sehr vage Vermutung. Und der phylogentische Baum ist auch an diesem Bereich nicht ganz sicher. Insofern kann man wohl nun eine Aussage darüber treffen, daß die Sequenz aus *Arabidopsis* einen archaeobakteriellen Ursprung hat. Der laterale Gentransfer zwischen Archae und *Thermotoga* ist im Zusammenhang mit der Sequenzierung des Genoms diskutiert worden [Nelson et al., 1999]. Es wurde aufgezeigt, daß auch in der Aminosäuresynthese viele Enzyme aus *Thermotoga* eine größere Ähnlichkeit mit archaeobakteriellen Homologen zeigen als mit eubakteriellen.

Die Abbildung 4.27 stellt die phylogenetische Analyse der oben genannten Enzyme im Zusammenhang mit ihrer Position in der Tryptophansynthese dar.



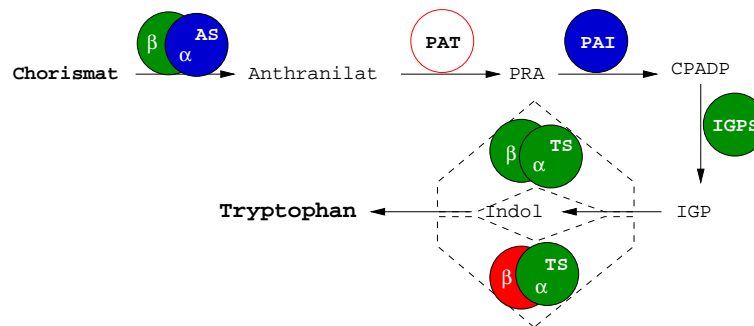


Abbildung 4.27: Phylogenetische Herkunft der Enzyme des Tryptophansynthese. **AS**: Anthranilatsynthase, **PAT**: Phosphoribosylanthranilattransferase, **PRA**: Phosphoribosylanthranilat, **PAI**: Phosphoribosylanthranilatisomerase, **CPADP**: 1-(O-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphat, **IGPS**: Indolglyceratphosphat-Synthase, **IGP**: Indolglyceratphosphat, **TS**: Tryptophan-Synthase mit zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ . Blaue Kreise kennzeichnen eine eubakterielle, rote eine archaebakterielle und grüne eine cyanobakterielle Herkunft.

### Synthese von Tyrosin und Phenylalanin

Der Biosyntheseweg von Tyrosin und Phenylalanin ist in Pflanzen noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Daher konnten für diesen Stoffwechselweg auch nur einige Enzyme phylogenetisch untersucht werden. Für die monofunktionelle **Chorismatmutase** (CM, siehe Anhang Abbildung A.78) aus *Arabidopsis* wurde nur ein homologes Enzym in Hefe gefunden, das zu 39 % identisch ist. Die archaebakterielle Sequenz aus *Methanococcus jannaschii* [MacBeath et al., 1998] unterscheidet sich so stark, daß kein multiples Alignment mit der monofunktionellen CM aus *Arabidopsis* möglich ist. Auch von der **Tyrosin-Aminotransferase** (Hydroxyphenylpyruvat-Aminotransferase, HPP-AT, siehe Anhang Abbildung A.79) konnte keine aussagekräftige Phylogenie berechnet werden. Diese Problematik trat auch schon bei der Analyse der Alanin-Aminotransferase auf, da die Aminotransferasen an sich nicht ausreichend annotiert sind.

Die bifunktionellen **CM/PDH** und **CM/PD** sind beide wahrscheinlich eubakteriellen Ursprungs. Im Falle der CM/PD weist das Enzym aus *Arabidopsis* die größte Ähnlichkeit mit dem ebenfalls bifunktionellen Enzym aus *Deinococcus* auf (40 % Identität). Diese Verwandtschaft wird durch die phylogenetische Analyse bestätigt. In dem phylogenetischen Baum der CM/PDH erscheint *Arabidopsis*

zusammen mit dem T-Protein aus *E.coli* [Ahmad and Jensen, 1987 und 1988]. Da diese Identität jedoch nur 25 % beträgt, im multiplen Alignment kaum konservierte Bereiche zu erkennen sind und die Sequenz nicht experimentell bestätigt worden ist, wird hier von einer Interpretation des Baumes abgesehen. Aus diesem Stoffwechselweg konnte letztendlich nur für die CM/PD eine Aussage hinsichtlich ihres eubakteriellen Ursprungs gemacht werden.

#### 4.2.6 Der Ursprung der Enzyme gleicht einem Mosaik

In dieser umfassenden Analyse der Biosynthesewege aller proteinogenen Aminosäuren wurde gezeigt, daß die Herkunft der Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel einem Mosaik gleicht. Insgesamt wurden 42 eubakterielle, acht archaebakterielle und 22 cyanobakterielle Vorläuforgene postuliert.

Auch wenn in dieser Analyse die Mehrzahl der Enzyme eubakteriell erscheint, so muß man bedenken, daß auch der Datensatz zum einem größten Teil aus eubakteriellen Sequenzen besteht. Es konnte leider nur ein Cyanobakterium in die Analyse mit einbezogen werden. Das Genom von *Synechocystis* [Kaneko et al., 1996] ist momentan das einzige cyanobakterielle Genom, das verfügbar ist. Würde man diese Analyse mit mehreren cyanobakteriellen Genomen wiederholen, so ist zu erwarten, daß noch mehr Enzyme einen cyanobakteriellen Ursprung zeigen. In dieser Analyse konnte nämlich nur dann die cyanobakterielle Herkunft eines Enzym postuliert werden, wenn es die größte Ähnlichkeit mit dem Homologen aus *Synechocystis* gezeigt hat. Ist es aber z. B. aufgrund des lateralen Gentransfers in Eubakterien [Martin, 1999, Doolittle, 1999, Ochman et al., 2000] zu einem Gentransfer zwischen *Synechocystis* und einem anderem Eubakterium gekommen, in dem ein cyanobakterielles Gen auf das Eubakterium übertragen wurde, so findet man die größte Ähnlichkeit vielleicht stattdessen mit dem Homologen aus dem Eubakterium.

Da der laterale Gentransfer nicht nur zwischen Eubakterien beobachtet wurde, sondern auch zwischen Eubakterien und Archaebakterien [Nelson et al., 1999], können ebenso mehr archaebakterielle Gene in diesem Stoffwechselweg enthalten sein als in der vorliegenden Arbeit identifiziert worden sind.

Auch wenn sich das Verhältnis zwischen den Enzymen mit einem eubakteriellen, archaebakteriellen und cyanobakteriellen Ursprung durch weitere Analysen mit mehr Genomen oder anderen phylogenetischen Algorithmen vielleicht noch ändern wird, ist und bleibt der Ursprung der Gene in diesem Stoffwechselweg vielfältig. Er stellt sich als ein Mosaik aus cyanobakteriellen, archaebakteriellen

und eubakteriellen Genen dar, in dem es scheinbar keine Regel gibt, wann ein Gen welcher Herkunft ist. Es wurden sowohl eubakterielle Gene in Plastiden (cyanobakterieller Endosymbiont) gefunden als auch cyanobakterielle Gene in Mitochondrien ( $\alpha$ -proteobakterieller Endosymbiont). Die Diversität reicht bis in die Untereinheiten von Enzymen und den funktionellen Einheiten von Polypeptiden hinein.

# Literaturverzeichnis

- [Adachi and Hasegawa, 1992] Adachi, J. and Hasegawa, M. (1992). MOLPHY: Programs for molecular phylogenetics, I. PROTML: Maximum likelihood inference of protein phylogeny. *Computer Science Monographs*, 27.
- [Alifano et al., 1996] Alifano, P., Fani, R., Lazcano, A., Bazzicalupo, M., Carlo-magno, M. S., and Bruni, C. B. (1996). Histidine biosynthetic pathway and genes: Structure, regulation and evolution. *Microb Rev*, 60(1):44–69.
- [Alting-Mees and Short, 1989] Alting-Mees, M. A. and Short, J. M. (1989). pbluescript ii: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res*, 17:4949.
- [Altschul et al., 1990] Altschul, S. F., Gish, W., Myers, W. M. E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403–410.
- [Altschul et al., 1997] Altschul, S. F., Madden, T. L., Zhang, A. A. S. J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389–3402.
- [Aubert et al., 1998] Aubert, S., Curien, G., Bligney, R., Gout, E., and Douce, R. (1998). Transport, compartimentation, and metabolism of homoserine in higher plants. *Plant Physiol*, 116:547–557.
- [Ausubel et al., 1999] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1999). *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., 4th edition.
- [Avila et al., 2001] Avila, C., Suarez, M. F., Gomez-Maldonado, J., and Canovas, F. M. (2001). Spatial and temporal expression of two cytosolic glutamine synthetase genes in Scots pine: functional implications on nitrogen metabolism during early stages of conifer development. *Plant J*, 25(1):93–102.
- [Azevedo et al., 1997] Azevedo, R. A., Arruda, P., Turner, W. L., and Leas, P. J. (1997). The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry*, 46(3):395–419.

- [Azevedo and Lea, 2001] Azevedo, R. A. and Lea, P. J. (2001). Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids*, 20:261–279.
- [Baker and Yon, 1983] Baker, S. R. and Yon, R. J. (1983). Characterization of ornithine carbamoyltransferase from cultured carrot cells of low embryonic potential. *Phytochemistry*, 22:2171–2174.
- [Bender, 1985] Bender, D. A. (1985). *Amino Acid Metabolism*. John Wiley & Sons Ltd.
- [Benton and Davis, 1977] Benton, W. D. and Davis, R. W. (1977). Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, 196:180–82.
- [Berlyn et al., 1989] Berlyn, M. B., Last, R. L., and Fink, G. R. (1989). A gene encoding the tryptophan synthase beta subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(12):4604–4608.
- [Bernasconi et al., 1995] Bernasconi, P., Woodworth, A. R., Rosen, B. A., Subramanian, M. V., and Siehl, D. L. (1995). A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *J Biol Chem*, 270(29):17381–17385.
- [Bischoff et al., 2001] Bischoff, M., Schaller, A., Bieri, F., Kessler, F., Amrhein, N., and Schmid, J. (2001). Molecular characterization of tomato 3-dehydroquinate dehydratase-shikimate:NADP oxidoreductase. *Plant Physiol*, 125(4):1891–1900.
- [Bogdanova et al., 1995] Bogdanova, N., Bork, C., and Hell, R. (1995). Cysteine biosynthesis in plants: isolation and functional identification of a cDNA encoding a serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 358(1):43–47.
- [Bohlmann et al., 1995] Bohlmann, J., DeLuca, V., Eilert, U., and Martin, W. (1995). Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: modes of expression and properties of native and recombinant enzymes. *Plant J*, 7(3):491–501.
- [Bonner and Jensen, 1985] Bonner, C. A. and Jensen, R. A. (1985). Novel features of prephenate aminotransferase from cell cultures of *Nicotiana glauca*. *Arch Biochem Biophys*, 238(1):237–246.
- [Bonner and Jensen, 1987a] Bonner, C. A. and Jensen, R. A. (1987a). Arogenate dehydrogenase. *Methods Enzymol*, 142:494.

- [Bonner and Jensen, 1987b] Bonner, C. A. and Jensen, R. A. (1987b). Prephenate aminotransferase. *Methods Enzymol*, 142:479–487.
- [Bonner and Jensen, 1994] Bonner, C. A. and Jensen, R. A. (1994). Cloning of cDNA encoding the bifunctional dehydroquinase.shikimate dehydrogenase of aromatic-amino-acid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *Biochem J*, 302(Pt 1):11–14.
- [Bonner and Varner, 1976] Bonner, J. and Varner, J. E. (1976). *Plant Biochemistry*. Academic Press, 3rd edition.
- [Boonchird et al., 1991] Boonchird, C., Messenguy, F., and Dubois, E. (1991). Characterization of the yeast ARG5,6 gene: determination of the nucleotide sequence, analysis of the control region and of ARG5,6 transcript. *Mol Gen Genet*, 220:154–166.
- [Bourguignon et al., 1996] Bourguignon, J., Merand, V., Rawsthorne, S., Forest, E., and Douce, R. (1996). Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis. *Biochem J*, 313:229–234.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Chem*, 72:248–254.
- [Brandenburg et al., 1998] Brandenburg, S. A., Williamson, C. L., and Slocum, R. D. (1998). Characterization of a cDNA encoding the small subunit of *Arabidopsis* carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol*, 117:717.
- [Bruce, 2000] Bruce, B. D. (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol*, 10:440–447.
- [Buchanan et al., 2000] Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- [Burr et al., 1976] Burr, B., Walker, J., Truffa-Bachi, P., and Cohen, G. N. (1976). Homoserinkinase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 62:519–526.
- [Cahoon et al., 2001] Cahoon, E. B., Cahoon, R. E., Hitz, W. D., and Rafalski, J. A. (2001). Ornithine biosynthesis enzymes. *United States Patent 6,242,256*.

- [Casado et al., 1995] Casado, A., Cabalero, J. L., Franco, A. R., Cardenas, J., Grant, M. R., and Munoz-Blanco, J. (1995). Molecular cloning of the gene encoding the L-asparaginase gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 108:1321–1322.
- [Casazza et al., 2000] Casazza, A. P., Basner, A., Hofgen, R., and Hesse, H. (2000). Expression of threonine synthase from *Solanum tuberosum* L. is not metabolically regulated by photosynthesis-related signals or by nitrogenous compounds. *Plant Sci*, 157(1):43–50.
- [Cassart et al., 1981] Cassart, P., Katinka, M., and Yaniv, M. (1981). Nucleotide sequence of the thrb gene of *E. coli* and its two adjacent regions; the thrab and thrC junctions. *Nucleic Acids Res*, 9(2):339–347.
- [Chang and Duggleby, 1997] Chang, A. K. and Duggleby, R. G. (1997). Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem J*, 327:161–169.
- [Chatterjee et al., 1994] Chatterjee, S. P., Singh, B. K., and Gilvarg, C. (1994). Biosynthesis of lysine in plants: the putative role of meso-diaminopimelate dehydrogenase. *Plant Mol Biol*, 26:285–290.
- [Chen and Schnell, 1999] Chen, X. and Schnell, D. J. (1999). Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol*, 9:222–227.
- [Clausen et al., 1999] Clausen, T., Wahl, M. C., Messerschmidt, A., Huber, R., Fuhrmann, J. C., Laber, B., Streber, W., and Steegborn, C. (1999). Cloning, purification and characterization of cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Nicotiana tabacum*. *Biol Chem*, 380:1237–1242.
- [Codd, 1970] Codd, E. F. (1970). A relational model of data for large shared data banks. *Communications of the ACM*, 13(6):377–387.
- [Connelly and Conn, 1986] Connelly, J. A. and Conn, E. E. (1986). Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: isolation and regulatory properties of arogenate dehydrogenase. *Z Naturforsch [C]*, 41(1-2):69–78.
- [Crespo et al., 1998] Crespo, J. L., Garcia-Dominguez, M., and Florencio, F. J. (1998). Nitrogen control of the glnn gene that codes for GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudoanabaena* sp. pcc 6903. *Mol Microb*, 30(5):1101–1112.
- [Curien et al., 1993] Curien, G., Dumas, R., and Douce, R. (1993). Nucleotide sequence and characterization of a cDNA encoding the acetohydroxy acid isomeroreductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 21:171–222.

- [Datko et al., 1974] Datko, A. H., Giovanelli, J., and Mudd, S. H. (1974). Homocysteine biosynthesis in green plants. O-phosphohomoserine is the physiological substrate for cystathionine  $\gamma$ -synthase. *J Bio Chem*, 249:1139–1155.
- [de Ruiter and Kollöffel, 1985] de Ruiter, H. and Kollöffel, C. (1985). Properties of ornithine carbamoyltransferase from *Pisum sativum*. *Plant Physiol*, 83:371–378.
- [Delauney et al., 1993] Delauney, A. J., Hu, C.-A. A., Kishor, P. B. K., and Verma, D. P. S. (1993). Cloning of ornithine  $\delta$ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem*, 268(25):18673–18678.
- [DeLuca and McElroy, 1978] DeLuca, M. and McElroy, W. D. (1978). Purification and properties of firefly luciferase. *Methods in Enzymology*, LVII:3–15.
- [Denes, 1970] Denes, G. (1970). N-acetylglutamate-5-phosphotransferase (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Methods in Biochemistry*, 17:269–272.
- [Devereux et al., 1984] Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the vax. *Nucleic Acids Res*, 2:387–395.
- [Devine et al., 1993] Devine, M., Duke, S. O., and Fedtke, C. (1993). Physiology of Herbicide Action. PTR Prentice-Hall.
- [Dickson et al., 1992] Dickson, J. M. J. J., Vincze, E., Grant, M. R., Smith, L. A., Rodber, K. A., Farnden, K. J. F., and Reynolds, P. H. S. (1992). Molecular cloning of the gene encoding seed L-asparaginase from *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol Biol*, 20:333–336.
- [Dincturk and Knaff, 2000] Dincturk, H. B. and Knaff, D. B. (2000). The evolution of glutamate synthase. *Mol Biol Rep*, 27:141–148.
- [Doolittle, 1999] Doolittle, W. F. (1999). Lateral genomics. *Trends in Genetics*, 9(12):M5–M8.
- [Douce et al., 2001] Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., and Rebeille, F. (2001). The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science*, 6(4):167–176.
- [Dougall, 1970] Dougall, D. K. (1970). Threonine deaminase from Paul's scarlett rose tissue cultures. *Phytochemistry*, 9:959–964.



- [Douglas and Penny, 1999] Douglas, S. E. and Penny, S. L. (1999). The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved syntenic groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol*, 48:236–244.
- [Droux et al., 1995] Droux, M., Ravanel, S., and Douce, R. (1995). Methionine biosynthesis in higher plants. II Purification and characterization of cystathionine  $\beta$ -lyase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):585–595.
- [Dubois et al., 1996] Dubois, F., Brugiere, N., Sangwan, R. S., and Hirel, B. (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol*, 31:803–817.
- [Dumas et al., 2001] Dumas, R., Biou, V., Halgand, F., Douce, R., and Duggleby, R. G. (2001). Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. *Acc Chem Res*, 34:399–408.
- [Dumas et al., 1989] Dumas, R., Joyard, J., and Douce, R. (1989). Purification and characterization of acetohydroxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem J*, 262:971–976.
- [Dumas et al., 1991] Dumas, R., Lebrun, M., and Douce, R. (1991). Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA encoding of acetohydroxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem J*, 277:469–475.
- [Eberhard et al., 1996] Eberhard, J., Ehrler, T. T., Eppe, P., Felix, G., Rasecke, H., Amrhein, N., and Schmid, J. (1996). Cytosolic and plastidic chorismate mutase isoenzymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties. *Plant J*, 10(5):815–821.
- [Eckermann et al., 2000] Eckermann, C., Eichel, J., and Schröder, J. (2000). Plant methionine synthase: new insights into properties and expression. *Biol Chem*, 381:695–703.
- [Eichel et al., 1995] Eichel, J., Gonzalez, J. C., Hotze, M., Matthews, R. G., and Schroder, J. (1995). Vitamin-b12-independent methionine synthase from a higher plant (*Catharanthus*). Molecular characterization, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. *Eur J Biochem*, 230(3):1053–1058.
- [Ellerström et al., 1992] Ellerström, M., Josefsson, L.-G., Rask, L., and Ronne, H. (1992). Cloning of a cDNA for rape chloroplast 3-isopropylmalate dehydrogenase by genetic complementation in yeast. *Plant Mol Biol*, 18:557–566.

- [Farrington et al., 1993] Farrington, G. K., Kumar, A., Sharmas, S. L., Ewaskiewicz, J. I., and Ash, D. E. (1993). Threonine synthase of *Escherichia coli*: inhibition by classical and slow-binding analogues of homoserine phosphate. *Arch Biochem Biophys*, 307(1):165–174.
- [Felsenstein, 1981] Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, 17:368–376.
- [Felsenstein, 1985] Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783–791.
- [Finnemann and Schjoerring, 2000] Finnemann, J. and Schjoerring, J. K. (2000). Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3-protein interaction. *Plant J*, 24(2):171–181.
- [Fischer and Jensen, 1987] Fischer, R. and Jensen, R. (1987). Arogenate dehydratase. *Methods Enzymol*, 142:495.
- [Flavin and Slaughter, 1960] Flavin, M. and Slaughter, C. (1960). Purification and properties of threonine synthetase of *Neurospora*. *J Biol Chem*, 235(4):1103–1108.
- [Flint and Emptage, 1988] Flint, D. H. and Emptage, M. H. (1988). Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. *J Biol Chem*, 263(8):3558–35564.
- [Friedemann and Haugen, 1943] Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. (1943). Pyruvic acid: the determination of keto acids in blood and urine. *J Biol Chem*, 147:415–442.
- [Fujimori and Ohta, 1998a] Fujimori, K. and Ohta, D. (1998a). An Arabidopsis cDNA encoding a bifunctional glutamine amidotransferase/cyclase suppresses the histidine auxotrophy of a *Saccharomyces cerevisiae his7* mutant. *FEBS Letters*, 428:229–234.
- [Fujimori and Ohta, 1998b] Fujimori, K. and Ohta, D. (1998b). Isolation and characterization of a histidine biosynthetic gene in Arabidopsis encoding a polypeptide with two separate domains for phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase and phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase. *Plant Physiol*, 118:275–283.
- [Fujimori et al., 1998] Fujimori, K., Tada, S., Kanai, S., and Ohta, D. (1998). Molecular cloning and characterization of the gene encoding N'[(5-phosphoribosyl)-formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (BBMII) isomerase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 259:216–223.

- [Fujita et al., 1998] Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R. A., and Csonka, L. N. (1998). Comparative analysis of the regulation of expression and structures of evolutionarily divergent genes for  $\delta$ -pyrroline-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiol*, 118:661–674.
- [Garcia-Dominguez et al., 1997] Garcia-Dominguez, M., Reyes, J. C., and Florencio, F. J. (1997). Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. *Eur J Biochem*, 244:258–264.
- [Gasser and Klee, 1990] Gasser, C. S. and Klee, H. J. (1990). A *Brassica napus* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *Nucleic Acids Res*, 18:2821.
- [Gil et al., 1999] Gil, F., Ramon-Maiques, S., Marina, A., Fita, I., and Rubio, V. (1999). N-acetylglutamate from *Escherichia coli*: cloning of the gene, purification, and crystallization of the recombinant enzyme and preliminary X-ray analysis of the free and ligand-bound forms. *Acta Cryst*, D55:1350–1352.
- [Gishlain et al., 1994] Gishlain, M., Frankard, V., Vandenbossche, D., Matthews, B. F., and Jacobs, M. (1994). Molecular analysis of the aspartate kinase-homoserine dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 24:835–851.
- [Glöckner et al., 2000] Glöckner, G., Rosenthal, A., and Valentin, K. (2000). The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J Mol Evol*, 51:382–390.
- [Goerlach et al., 1993] Goerlach, J., Schmid, J., and Amrhein, N. (1993). Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. II. chorismate synthase. *Plant Mol Biol*, 23:707–716.
- [Görlach et al., 1993] Görlach, J., Beck, A., Henstrand, J. M., Handa, A. K., Herrmann, K. M., Schmid, J., and Amrhein, N. (1993). Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. I. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *Plant Mol Biol*, 23:697–706.
- [Gray, 1998] Gray, M. W. (1998). Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*, 396:109–110.
- [Gruhl et al., 1995] Gruhl, J. W., Hudspeth, R. L., Hobbs, S. L., and Anderson, D. M. (1995). Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid

- synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. *Plant Mol Biol*, 28(5):837–846.
- [Gubler and Hoffman, 1983] Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25:263–269.
- [Haas and Leisinger, 1975] Haas, D. and Leisinger, T. (1975). N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem*, 52:365–375.
- [Hasegawa and Kishino, 1994] Hasegawa, M. and Kishino, H. (1994). Accuracies of the simple methods for estimating the bootstrap probability of a maximum-likelihood tree. *Mol Biol Evol*, 11:142–145.
- [Hattori et al., 1995] Hattori, J., Brown, D., Mourad, G., Labbe, H., Quellet, T., Sunohara, G., Rutledge, R., King, J., and Miki, B. (1995). An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. *Mol Gen Genet*, 246:419–425.
- [Helmchen et al., 1995] Helmchen, T. A., Bhattacharya, D., and Melkonian, M. (1995). Analyses of ribosomal RNA sequences from glaucocystophyte cyanobacteria provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. *J Mol Evol*, 41:203–210.
- [Herrmann, 1995] Herrmann, K. (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol*, 107:7–12.
- [Herrmann and Weaver, 1999] Herrmann, K. and Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:473–503.
- [Hershey et al., 1999] Hershey, H. P., Schwartz, L. J., Gale, J. P., and Abell, L. M. (1999). Cloning and functional expression of the small subunit of acetolactate synthase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol*, 40:795–806.
- [Hesse and Altmann, 1995] Hesse, H. and Altmann, T. (1995). Molecular cloning of a cysteine synthase cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 108:851–852.
- [Hesse et al., 2001] Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., Willmitzer, L., and Höfgen, R. (2001). Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants. *Amino Acids*, 20:281–289.
- [Higgins and Gibson, 1994] Higgins, J. T. D. and Gibson, T. (1994). Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through

- sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22.
- [Hildmann et al., 1992] Hildmann, T., Ebner, M., Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., and Prat, S. (1992). General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell*, 4(9):1157–1170.
- [Ho et al., 1999a] Ho, C.-L., Noji, M., and Saito, K. (1999a). Regulation of serine biosynthesis: molecular cloning and expression of 3-phosphoserine phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 274(16):11007–11012.
- [Ho et al., 1999b] Ho, C.-L., Noji, M., Saito, M., and Saito, K. (1999b). Regulation of serine biosynthesis in *Arabidopsis*: crucial role of plastidic 3-phosphoglycerate dehydrogenase in non-photosynthetic tissues. *J Biol Chem*, 274(1):397–402.
- [Ho and Saito, 2001] Ho, C.-L. and Saito, K. (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, 20:243–259.
- [Hoare and Hoare, 1966] Hoare, D. S. and Hoare, S. L. (1966). Feedback regulation of arginine biosynthesis in blue-green algae and photosynthetic bacteria. *J Bacteriol*, 92(2):375–379.
- [Hock and Elstner, 1995] Hock, B. and Elstner, E. F. (1995). Schadwirkungen auf Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Holzer et al., 1963] Holzer, H., Boll, M., and Cennamo, C. (1963). Zur Biochemie der Threonin-Deaminase aus Hefe. *Angew Chemie*, 75(19):894–900.
- [Howarth et al., 1997] Howarth, J. R., Roberts, M. A., and Wray, J. L. (1997). Cysteine biosynthesis in higher plants: a new member of the *Arabidopsis thaliana* serine acetyltransferase small gene-family obtained by functional complementation of an *Escherichia coli* cysteine auxotroph. *Biochim Biophys Acta*, 1350(2):123–127.
- [Hu et al., 1992] Hu, C.-A., Delauney, A. J., and Verma, D. P. S. (1992). A bifunctional enzyme ( $\delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:9354–9358.
- [Huelsenbeck, 1995] Huelsenbeck, J. P. (1995). The robustness of two phylogenetic methods: four-taxon simulations reveal a slight superiority of maximum-likelihood over neighbor-joining. *Mol Biol Evol*, 12:843–849.

- [Huffel et al., 1992] Huffel, C. V., Dubois, E., and Messenguy, F. (1992). Cloning and sequencing of *arg3* and *arg11* genes of *Schizosaccharomyces pombe* on a 10-kb DNA fragment. *Eur J Biochem*, 205:33–43.
- [Huo and Viola, 1996] Huo, X. and Viola, R. E. (1996). Substrate specificity and identification of functional groups of homoserine kinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 35:16180–16185.
- [Jackson et al., 1993] Jackson, S. D., Sonnewald, U., and Willmitzer, L. (1993). Cloning and expression analysis of  $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase from potato. *Mol Gen Genet*, 236:309–314.
- [Jones et al., 1992] Jones, D. T., Taylor, W. R., and Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp Appl Biosci*, 8:275–282.
- [Jost et al., 2000] Jost, R., Berkowitz, O., Wirtz, M., Hopkins, L., Hawkesford, M. J., and Hell, R. (2000). Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 253:237–247.
- [Jung et al., 1986] Jung, E., Zamir, L. O., and Jensen, R. A. (1986). Chloroplasts of higher plants synthesize L-phenylalanine via L-arogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:7231–7235.
- [Kaneko et al., 1996] Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain pcc6803. II. sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res*, 3(3):109–136.
- [Keith et al., 1991] Keith, B., Dong, X., Ausubel, F. M., and Fink, G. R. (1991). Differential induction of 3-desoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:8821–8825.
- [Kikuchi et al., 1999] Kikuchi, H., Hirose, S., Toki, S., Akama, K., and Takaiwa, F. (1999). Molecular characterization of a gene for alanine aminotransferase from rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol Biol*, 39:149–159.

- [Kim and Leustek, 1996] Kim, J. and Leustek, T. (1996). Cloning and analysis of the gene for cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 32:1117–1124.
- [Klee et al., 1987] Klee, H. J., Muskopf, Y. M., and Gasser, C. S. (1987). Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate tolerant plants. *Mol Gen Genet*.
- [Krath and Hove-Jensen, 1999] Krath, B. N. and Hove-Jensen, B. (1999). Organellar and cytosolic localization of four phosphoribosyl diphosphate synthase isoenzymes in spinach. *Plant Physiol*, 119:497–505.
- [Kreft et al., 1994] Kreft, B. D., Townsend, A., Pohlenz, H., and Laber, B. (1994). Purification and properties of cystathionine  $\gamma$ -synthase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 104:1215–1220.
- [Kumada et al., 1993] Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Holsted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., Wohlleben, W., and Tateno, Y. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:3009–3013.
- [Kyhse-Andersen, 1984] Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem Biophys Meth*, 10:203–209.
- [Labedan et al., 2000] Labedan, B., Boyen, A., beatens, M., Charlier, D., Chen, P., Cunin, R., Durbeco, V., Glansdorf, N., Herve, G., Legrain, C., Liang, Z., Purcarea, C., Roovers, M., Sanchez, R., Toong, T., de Castele, M. V., van Vliet, F., Xu, Y., and Zhang, Y. (2000). The evolutionary history of carbamoyltransferases: a complex set of paralogous genes was already present in the last universal common ancestor. *J Mol Evol*, 49:461–473.
- [Laber et al., 1999] Laber, B., Maurer, W., Hanke, C., Gräfe, S., Ehlert, S., Messerschmidt, A., and Clausen, T. (1999). Characterization of recombinant *Arabidopsis thaliana* threonine synthase. *Eur J Biochem*, 263:212–221.
- [Laemmli, 1970] Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- [Lam et al., 1995] Lam, H.-M., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M., and Coruzzi, G. (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, 7:887–898.

- [Lam et al., 1996] Lam, H.-M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G. M. (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47:569–593.
- [Lam et al., 1994] Lam, H.-M., Peng, S. S.-Y., and Coruzzi, G. M. (1994). Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 106.
- [Lancien et al., 2000] Lancien, M., Gadal, P., and Hodges, M. (2000). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*, 123:817–824.
- [Lee and Leustek, 1999a] Lee, M. and Leustek, T. (1999a). Identification of the gene encoding homoserine kinase from *Arabidopsis thaliana* and characterization of the recombinant enzyme derived from the gene. *Arch Biochem Biophys*, 372(1):135–142.
- [Lee and Leustek, 1999b] Lee, M. and Leustek, T. (1999b). Identification of the gene encoding homoserine kinase from *Arabidopsis thaliana* and characterization of the recombinant enzyme derived from the gene. *Arch Biochem Biophys*, 372:135–144.
- [Lee and Duggleby, 2001] Lee, Y.-T. and Duggleby, R. G. (2001). Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry*, 40:6836–6844.
- [Li et al., 1995] Li, J., Zhao, J., Rose, A. B., Schmidt, R., and Last, R. L. (1995). *Arabidopsis* phosphoribosylanthranilate isomerase: molecular genetic analysis of triplicate tryptophan pathway genes. *Plant Cell*, 7:447–461.
- [Lipmann and Tuttle, 1945] Lipmann, F. and Tuttle, L. C. (1945). A specific micro-method for the determination of acyl phosphates. *J Biol Chem*, pages 21–28.
- [Lundovkikh et al., 2000] Lundovkikh, I., Dementieva, E., and Ugarova, N. (2000). Recombinant firefly luciferase in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 88:127–136.
- [Lutziger and Oliver, 2001] Lutziger, I. and Oliver, D. J. (2001). Characterization of two cDNAs encoding mitochondrial lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 27(2):615–623.
- [MacBeath et al., 1998] MacBeath, G., Kast, P., and Hilvert, D. (1998). A small thermostable and monofunctional chorismate mutase from the archeon *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry*, 37:10062–10073.



- [Macheroux et al., 1999] Macheroux, P., Schmid, J., Amrhein, N., and Schaller, A. (1999). A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta*, 207:325–334.
- [Malki et al., 1998] Malki, F., Frankard, V., and Jacobs, M. (1998). Molecular cloning and expression of cDNA sequence encoding histidinol phosphate aminotransferase from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 37:1013–1022.
- [Malki and Jacobs, 2001] Malki, F. E. and Jacobs, M. (2001). Molecular characterization and expression study of a histidine auxotrophic mutant (his1-) of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol*, 45:191–199.
- [Mannhaupt et al., 1990] Mannhaupt, G., Pohlenz, H., Seefluth, A. K., Pilz, U., and Feldmann, H. (1990). Yeast homoserine kinase. *Eur J Biochem*, 191:115–122.
- [Martin, 1999] Martin, W. (1999). Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes. *BioEssays*, 21:99–104.
- [Mazelis et al., 1976] Mazelis, M., Miflin, B. J., and Pratt, H. M. (1976). A chloroplast-localized diaminopimelate decarboxylase in higher plants. *FEBS letters*, 64(1):197–200.
- [McClung et al., 2000] McClung, C. R., Hsu, M., Painter, J. E., Gagne, J. M., karlsberg, S. D., and Salome, P. A. (2000). Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two Arabidopsis genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiol*, 123:381–391.
- [McKay and Shargool, 1981] McKay, G. and Shargool, P. D. (1981). Purification and characterization of n-acetylglutamate-5-phosphotransferase from pea (*Pisum sativum*) cotyledons. *Biochem J*, 195:71–81.
- [Melo-Oliveira et al., 1996] Melo-Oliveira, R., Oliveira, I. C., and Coruzzi, G. M. (1996). Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4718–4723.
- [Mereschkowsky, 1905] Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt*, 25(18):593–604.
- [Mobley et al., 1999] Mobley, E. M., Kunkel, B. N., and Keith, B. (1999). Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 240:115–123.

- [Moreland, 1993] Moreland, D. E. (1993). Research on biochemistry of herbicides: and historical overview. *Z Naturforsch*, 48c:121–131.
- [Morris and Thompson, 1977] Morris, C. J. and Thompson, J. F. (1977). Formation of N-Acetylglutamate by extracts of higher plants. *Plant Physiol*, 59:684–687.
- [Mouillon et al., 1999] Mouillon, J., Aubert, S., Bourguignon, J., Gout, E., Douce, R., and Rebeille, F. (1999). Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J*, 20(2):197–205.
- [Mourad et al., 1998] Mourad, G., Emerick, R., Marion, A., and Smith, A. (1998). Cloning and sequencing of a cDNA encoding threonine dehydratase/deaminase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 118:1534.
- [Mourad et al., 2000] Mourad, G., Emerick, R., and Smith, A. (2000). Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding an isoleucine feedback insensitive threonine dehydratase/deaminase of *Arabidopsis thaliana* line GM11b (Accession No. AF177212). *Plant Physiol (PGR00-20)*, 122:619.
- [Mourad and King, 1992] Mourad, G. and King, J. (1992). Effect of four classes of herbicides on growth and acetolactate-synthase activity in several variants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 188:491–497.
- [Muench and Good, 1994] Muench, D. G. and Good, A. G. (1994). Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase: cDNA cloning and expression analysis. *Plant Mol Biol*, 24(3):417–427.
- [Nagai et al., 1991] Nagai, A., Ward, E., Beck, J., Tada, S., Chang, J., Scheidegger, A., and Ryals, J. (1991). Structural and functional conservation of histidinol dehydrogenase between plants and microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4133–4137.
- [Navarro et al., 1995] Navarro, F., Chavez, S., Candau, P., and Florencio, F. J. (1995). Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis sp. pcc 6803*. isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. *Plant Mol Biol*, 27.
- [Nelson et al., 1999] Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A.,

- White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C., and Fraser, C. M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399:323–329.
- [Nesbo et al., 2001] Nesbo, C. L., L'Haridon, S., Stetter, K. O., and Doolittle, W. F. (2001). Phylogenetic analyses of two archaeal genes in *Thermotoga maritima* reveal multiple transfers between archaea and bacteria. *Mol Biol Evol*, 18(3):362–375.
- [Neuburger et al., 2000] Neuburger, M., Polidori, A. M., Pietre, E., Faure, M., Jourdain, A., Bourguignon, J., Pucci, B., and Douce, R. (2000). Interaction between lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system. *Eur J Biochem*, 267:2882–2889.
- [Nishida et al., 1999] Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T., and Yamane, H. (1999). A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Research*, 9:1175–1183.
- [Niyogi and Fink, 1992] Niyogi, K. K. and Fink, G. R. (1992). Two anthranilate synthase genes in Arabidopsis: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell*, 4(6):721–733.
- [Niyogi et al., 1993] Niyogi, K. K., Last, R. L., Fink, G. R., and Keith, B. (1993). Suppressors of trp1 fluorescence identify a new Arabidopsis gene, TRP4, encoding the anthranilate synthase beta subunit. *Plant Cell*, 5(9):1011–1027.
- [Ochman et al., 2000] Ochman, H., Lawrence, J. G., and Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405:299–304.
- [Ohta et al., 2000] Ohta, D., Fujimori, K., Mizutani, M., Nakayama, Y., Kunpaisal-Hashimoto, R., Münzer, S., and Kozaki, A. (2000). Molecular cloning and characterization of ATP-phosphoribosyl transferase from Arabidopsis. A key enzyme in the histidine biosynthetic pathway. *Plant Physiol*, 122:907–914.
- [Ohta et al., 1994] Ohta, N., Sato, N., Kawano, S., and Kuroiwa, T. (1994). The trpa gene on the plastid genome of *Cyanidium caldarium* strain RK-1. *Curr Genet*, 25(4):357–361.

- [Oliveira and Coruzzi, 1999] Oliveira, I. C. and Coruzzi, G. M. (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 121:301–309.
- [Pang and Duggleby, 1999] Pang, S. S. and Duggleby, R. G. (1999). Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry*, 38:5222–5231.
- [Parsot et al., 1988] Parsot, C., Boyen, A., Cohen, G. N., and Glansdorf, N. (1988). Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *argB* und *argC* genes: comparison of N-acetylglutamate kinase and N-acetylglutamate- $\gamma$ -semialdehyde dehydrogenase with homologous and analogous enzymes. *Gene*, 68:275–283.
- [Pavesi et al., 2000] Pavesi, A., Ficarelli, A., Tassi, F., and Restivo, F. M. (2000). Cloning of two glutamate dehydrogenase cDNAs from *Asparagus officinalis*: Sequence analysis and evolutionary implications. *Genome*, 43:306–316.
- [Persans et al., 1999] Persans, M. W., Yan, X., Patnoe, J.-M. M. L., Krämer, U., and Salt, D. E. (1999). Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* (Halacys. *Plant Physiol*, 121:117–1126.
- [Pinto et al., 1986] Pinto, J. E. B. P., Suzich, J. A., and Herrmann, K. M. (1986). 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from potato tuber (*Solanum tuberosum* l.). *Plant Physiol*, 82:1040–1044.
- [Porath et al., 1975] Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975). Metal chelat affinity chromatographie, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258:598–599.
- [Pruitt and Last, 1993] Pruitt, K. D. and Last, R. L. (1993). Expression patterns of duplicate tryptophan synthase beta genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 102(3):1019–1026.
- [Quesada et al., 1999] Quesada, V., Ponce, M. R., and Micol, J. L. (1999). *OTC* and *AULL*, two convergent and overlappig genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461:101–106.
- [Radwanski et al., 1995] Radwanski, E. R., Zhao, J., and Last, R. L. (1995). *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase alpha: gene cloning, expression, and subunit interaction. *Mol Gen Genet*, 248:657–667.
- [Ravanel et al., 1995a] Ravanel, S., Droux, M., and Douce, R. (1995a). Methionine biosynthesis in higher plants. I Purification and characterization of

- cystathionine  $\gamma$ -synthase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):572–584.
- [Ravanel et al., 1998] Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D., and Douce, R. (1998). Cystathionine  $\gamma$ -synthase from *Arabidopsis thaliana*: purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 331:639–648.
- [Ravanel et al., 1996] Ravanel, S., Job, D., and Douce, R. (1996). Purification and properties of cystathionine  $\beta$ -lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 320:383–392.
- [Ravanel et al., 1995b] Ravanel, S., Ruffet, M. L., and Douce, R. (1995b). Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cystathionine  $\beta$ -lyase by functional complementation in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol*, 29:875–882.
- [Reith and Munholland, 1993] Reith, M. and Munholland, J. (1993). Two amino-acid biosynthetic genes are encoded on the plastid genome of the red alga porphyra umbilicalis. *Curr Genet*, 23(1):59–65.
- [Richter, 1998] Richter, G. (1998). Stoffwechselphysiologie der pflanzen. Thieme.
- [Ridley et al., 1998] Ridley, S. M., Elliott, A. C., Yeung, M., and Youle, D. (1998). High-Throughput Screening as a tool for agrochemical discovery: automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pestic Sci*, 54:327–337.
- [Ro and Miles, 1999] Ro, H. S. and Miles, E. W. (1999). Structure and function of the tryptophan synthase  $\alpha_2\beta_2$  complex. *J Biol Chem*, 274(51):36439–36445.
- [Roberts and Wray, 1996] Roberts, M. A. and Wray, J. L. (1996). Cloning and characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding an organellar isoform of serine acetyltransferase. *Plant Mol Biol*, 30(5):1041–1049.
- [Roosens et al., 1998] Roosens, N. H. C. J., Thu, T., Iskandar, H. M., and Jacobs, M. (1998). Isolation of the ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 117:263–271.
- [Rose et al., 1992] Rose, A. B., Casselmann, A. L., and Last, R. L. (1992). A phosphoribosylanthranilate transferase gene is defective in blue fluorescent *Arabidopsis thaliana* tryptophan mutants. *Plant Physiol*, 100(582-592).

- [Rosenberg et al., 1987] Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56:125–135.
- [Ruffet et al., 1995] Ruffet, M. L., Lebrun, M., Droux, M., and R. Douce (1995). Subcellular distribution of serine acetyltransferase from *Pisum sativum* and characterization of an *Arabidopsis thaliana* putative cytosolic isoform. *Eur J Biochem*, 227(1-2):500–509.
- [Saiki et al., 1988] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–91.
- [Saitou and Nei, 1987] Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406–425.
- [Samach et al., 1991] Samach, A., Hareven, D., Gutfinger, T., Ken-Dror, S., and Lifschitz, E. (1991). Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proc Nat Acad Sci USA*, 88:2678–2682.
- [Sambrook et al., 1989] Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition.
- [Sarrobot et al., 2000] Sarrobot, C., Thibaud, M.-C., Contard-David, P., Ginsté, S., Bechtold, N., Robaglia, C., and Nussaume, L. (2000). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene. *Plant J*, 24(3):357–367.
- [Sathasivan et al., 1990] Sathasivan, K., Haughn, G. W., and Murai, N. (1990). Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an midazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. columbia. *Nucleic Acids Res*, 18(8):2188.
- [Schloss et al., 1988] Schloss, J. V., Ciskanik, L. M., and Dyk, D. E. V. (1988). Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature*, 331:360–362.
- [Schmid and Amrhein, 1995] Schmid, J. and Amrhein, N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathways in higher plants. *Phytochemistry*, 39(4):737–749.

- [Schmidheini et al., 1989] Schmidheini, T., Sperisen, P., G. Paravicini, Hutter, R., and G. Braus (1989). A single point mutation results in a constitutively activated and feedback-resistant chorismate mutase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 171(3):1245–1253.
- [Schnappauf et al., 1998] Schnappauf, G., Krappmann, S., and Braus, G. H. (1998). Tyrosine and tryptophan act through the same binding site at the dimer interface of yeast chorismate mutase. *J Biol Chem*, 273(27):17012–17017.
- [Schultes et al., 1990] Schultes, N. P., Ellington, A. D., Cherry, J. M., and Szostak, J. W. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* homoserine kinase is homologous to prokaryotic homoserine kinases. *Gene*, 96(2):177–180.
- [Schultz and Coruzzi, 1995] Schultz, C. J. and Coruzzi, G. M. (1995). The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. *Plant J*, 7(1):61–75.
- [Schwarz-Sommer et al., 1987] Schwarz-Sommer, Z., Sheperd, N., Tacke, E., Gierl, A., Rohde, W., Leclerc, L., Mattes, M., Berndtgen, R., Pertersen, P. A., and Saedler, H. (1987). Influence of transposable elements on the structure and function of the *al* gene of *Zea mays*. *EMBO J*, 6:287–294.
- [Seigler, 1998] Seigler, D. S. (1998). *Plant secondary metabolism*. Kluwer Academic.
- [Sharma and Mazumder, 1970] Sharma, R. K. and Mazumder, R. (1970). Purification, properties and feedback control of L-threonine dehydratase from spinach. *J Biol Chem*, 245(11):3008–3014.
- [Shibata et al., 1986] Shibata, H. H., Ochiai, H., Sawa, Y., and Miyoshi, S. (1986). Localization of carbamoyl phosphate synthetase and aspartate carbamoyltransferase in chloroplasts. *Plant Physiol*, 80:126–129.
- [Shizuta et al., 1973] Shizuta, Y., Kurosawa, A., Inoue, K., Tanabe, T., and Hayashi, O. (1973). Regulation of biodegradative threonine deaminase. *J Biol Chem*, 248(2):512–520.
- [Short et al., 1988] Short, J., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. (1988). Lambda zap: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*, 16:7583–7600.
- [Siehl and Conn, 1988] Siehl, D. L. and Conn, E. E. (1988). Kinetic and regulatory properties of aspartate dehydratase in seedlings of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Arch Biochem Biophys*, 260(2):822–829.

- [Siehl et al., 1986] Siehl, D. L., Connelly, J. A., and Conn, E. E. (1986). Tyrosine biosynthesis in *Sorghum bicolor*: characteristics of prephenate aminotransferase. *Z Naturforsch [C]*, 41(1-2):79–86.
- [Singh et al., 1985] Singh, B. K., Connelly, J. A., and Conn, E. E. (1985). Chorismate mutase isoenzymes from *Sorghum bicolor*: purification and properties. *Arch Biochem Biophys*, 243(2):374–384.
- [Skarstedt and Greeer, 1973] Skarstedt, M. T. and Greeer, S. B. (1973). Threonine synthetase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 248(3):1032–1044.
- [Slocum et al., 1990] Slocum, R. D., Williamson, C. L., Poggenburg, C. A., and Lynes, M. A. (1990). Immunological characterization of plant ornithine transcarbamylases. *Plant Physiol*, 92:1205–1215.
- [Son and Sugiyama, 1992] Son, D. and Sugiyama, T. (1992). Nitrogen-dependent regulation of the gene for alanine aminotransferase which is involved in the C4 pathway of *Panicum miliaceum*. *Plant Mol Biol*, 20:705–713.
- [Steinrücken and Amrhein, 1980] Steinrücken, H. C. and Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid 3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 94:1207–1212.
- [Stratagene, 1997] Stratagene (1997). *Lambda ZAP II predigested EcoRI/CIAP-treated vector*.
- [Strauss et al., 1985] Strauss, A., Fankhauser, H., and King, P. J. (1985). Isolation and cryopreservation of O-methylthreonine-resistant *Rosa* cell lines altered in the feedback sensitivity of L-threonine deaminase. *Planta*, 163:554–562.
- [Strizhov et al., 1997] Strizhov, N., Abraham, E., Ökres, L., Blicking, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., and Szabados, L. (1997). Differential expression of two p5cs genes controlling proline accumulation during salt-stress and is regulated by aba1, abi1 and axr2 in Arabidopsis. *Plant J*, 12(3):557–569.
- [Studier et al., 1990] Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol*, 185:60–89.
- [Suzich et al., 1985] Suzich, J. A., Dean, J. F. D., and Herrmann, K. M. (1985). 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme. *Plant Physiol*, 79:765–770.



- [Tada et al., 1994] Tada, S., Volrath, S., Guyer, D., Scheidegger, A., Ryals, J., Ohta, D., and Ward, E. (1994). Isolation and characterization of cDNAs encoding imidazoleglycerolphosphate dehydratase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 105:579–583.
- [Temple et al., 1998] Temple, S. J., Vance, C. P., and Gantt, J. S. (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plant Science*, 3(2):51–56.
- [Thomazeau et al., 2000] Thomazeau, K., Curien, G., Dumas, R., and Biou, V. (2000). Crystal structure of threonine synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science*, 10:638–648.
- [Thompson, 1980] Thompson, J. F. (1980). *The Biochemistry of plants*, volume 5. Academic Press, INC (London) LTD.
- [Tozawa et al., 2001] Tozawa, Y., Hasegawa, H., Terakawa, T., and Wakasa, K. (2001). Characterization of rice anthranilate synthase alpha-subunit genes OASA1 and OASA2. tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-intensive mutant of OASA1. *Plant Physiol*, 126(4):1493–1506.
- [Trepp et al., 1999] Trepp, G. B., van de Mortel, M., Yoshioka, H., Miller, S. S., Samac, D. A., Gantt, J. S., and Vance, C. P. (1999). NADH-Glutamate synthase in alfalfa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. *Plant Physiol*, 119:817–828.
- [Turano et al., 1997] Turano, F. J., Thakkar, S. S., Fang, T., and Weisemann, J. M. (1997). Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 113:1329–1341.
- [Turner and Young, 2000] Turner, S. L. and Young, J. P. W. (2000). The glutamine synthetase of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, 17(2):309–319.
- [Udaka, 1966] Udaka, S. (1966). Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bacteriol*, 91:617–621.
- [van den Hoff et al., 1995] van den Hoff, M. J. B., Jonker, A., Beintema, J. J., and Lamers, W. H. (1995). Evolutionary relationships of the carbamoylphosphate synthetase genes. *J Mol Evol*, 41:813–832.
- [Vauterin et al., 1999] Vauterin, M., Frankard, V., and Jacobs, M. (1999). The *Arabidopsis thaliana* dhds gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner. *Plant Mol Biol*, 39:695–708.

- [Vauterin and Jacobs, 1994] Vauterin, M. and Jacobs, M. (1994). Isolation of a polar and a *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone. *Plant Mol Biol*, 25:545–550.
- [Verbruggen et al., 1993] Verbruggen, N., Villarroel, R., and Montagu, M. V. (1993). Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 103:771–781.
- [Viola, 2001] Viola, R. E. (2001). The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. *Acc Chem Res*, 34:339–349.
- [Wall and Schwartz, 2001] Wall, L. and Schwartz, R. L. (2001). *Programmieren in Perl*. O'Reilly Verlag.
- [Wallsgrave et al., 1983] Wallsgrave, R. M., Lea, P. J., and Mifflin, B. J. (1983). Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. *Plant Physiol*, 71:780–784.
- [Wilkie et al., 1995] Wilkie, S. E., Roper, J. M., Smith, A. G., and Warren, M. J. (1995). Isolation, characterization and expression of a cDNA clone encoding plastid aspartate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 27:1227–1233.
- [Winefield et al., 1995] Winefield, C. S., Farnden, K. J. F., Reynolds, P. H. S., and Marshall, C. J. (1995). Evolutionary analysis of aspartate aminotransferases. *J Mol Evol*, 40:455–463.
- [Wirtz et al., 2001] Wirtz, M., Berkowitz, O., Droux, M., and Hell, R. (2001). The cysteine synthase complex from plants. *Eur J Biochem*, 268:686–693.
- [Wolf and Weiss, 1980] Wolf, E. and Weiss, R. (1980). Acetylglutamate kinase. a mitochondrial feedback-sensitive enzyme of arginine biosynthesis in *neurospora crassa*. *J Biol Chem*, 255(19):9189–9195.
- [Yamagata et al., 1998] Yamagata, H., Nakajima, A., Bowler, C., and Iwasaki, T. (1998). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding asparagine synthetase from soybean (*Glycine max* L.) cell cultures. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62(1):148–150.
- [Ye et al., 2001] Ye, G., Hadjukiewicz, P. T. J., Broyles, D., Rodriguez, D., Xu, C. W., Nehra, N., and Staub, J. M. (2001). Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, 25(3):261–270.

- [Zalkin and Yanofsky, 1982] Zalkin, H. and Yanofsky, C. (1982). Yeast gene TRP5: structure, function, regulation. *J Biol Chem*, 257(3):1491–1500.
- [Zhang et al., 1999] Zhang, J., Chung, T. D. Y., and Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 4(2):67–73.
- [Zhang et al., 1998] Zhang, S., Pohnert, G., Kongsaree, P., Wilson, D. B., Clardy, J., and Ganem, B. (1998). Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 273(11):6248–6253.
- [Zhao and Last, 1995] Zhao, J. and Last, R. L. (1995). Immunological characterization and chloroplast localization of the tryptophan biosynthetic enzymes of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 270(11):6081–6087.
- [Zhou et al., 2000] Zhou, Z., Metcalf, A. E., Lovatt, C. J., and Hyman, B. C. (2000). Alfalfa (*Medicago sativa*) carbamoylphosphate synthetase gene structure records the deep lineage of plants. *Gene*, 43:105–114.

# A

## ML-Bäume der Enzyme

Auf den folgenden Seiten sind alle ML-Bäume in der Reihenfolge dargestellt, in der sie in dieser Arbeit besprochen wurden. Sie sind in der Tabelle 3.1 nach ihrem Vorkommen in den einzelnen Stoffwechselwegen aufgelistet.



Abbildung A.1: Glutaminsynthetase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 1

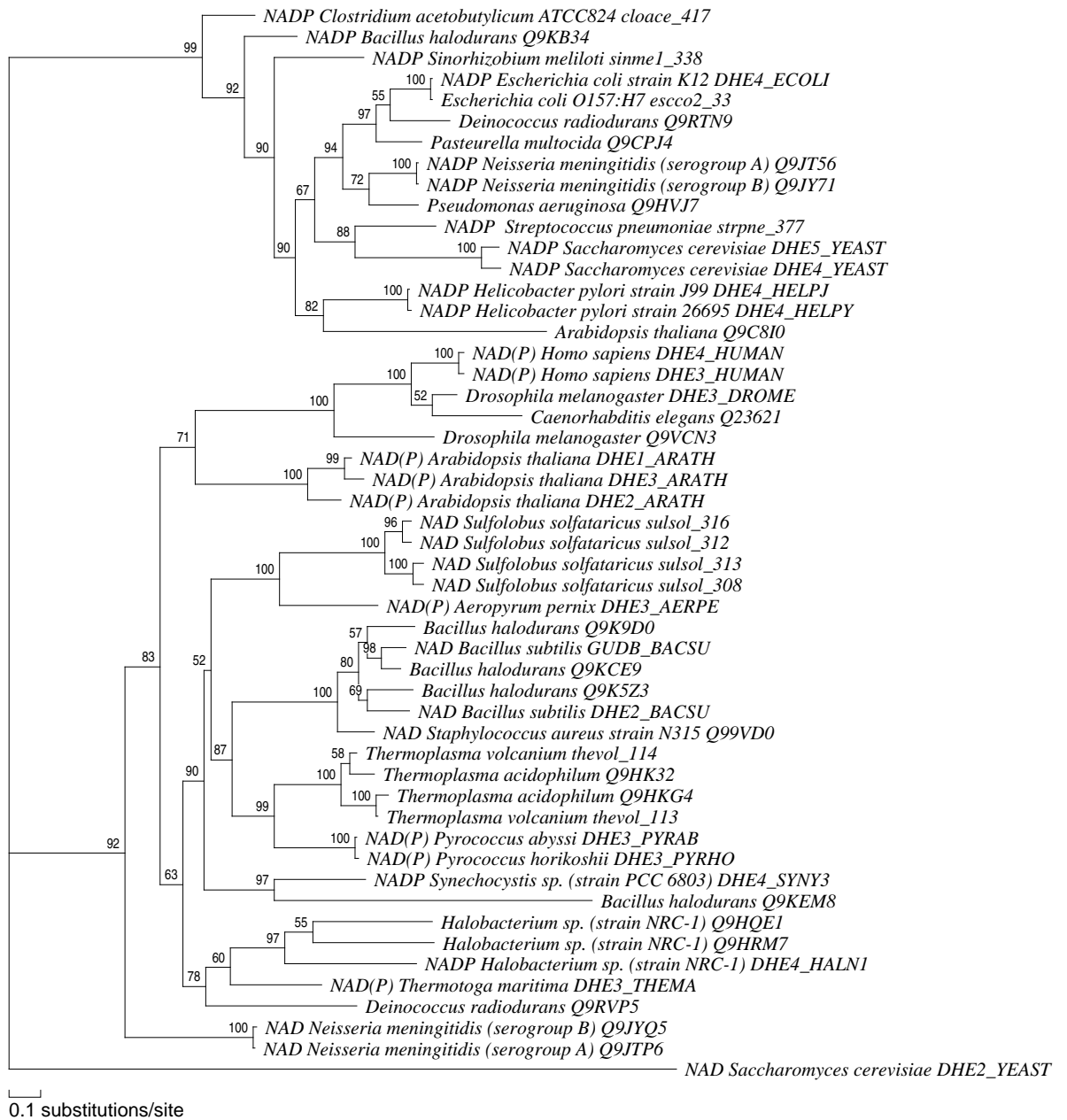


Abbildung A.2: Glutamatdehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 2 und 3

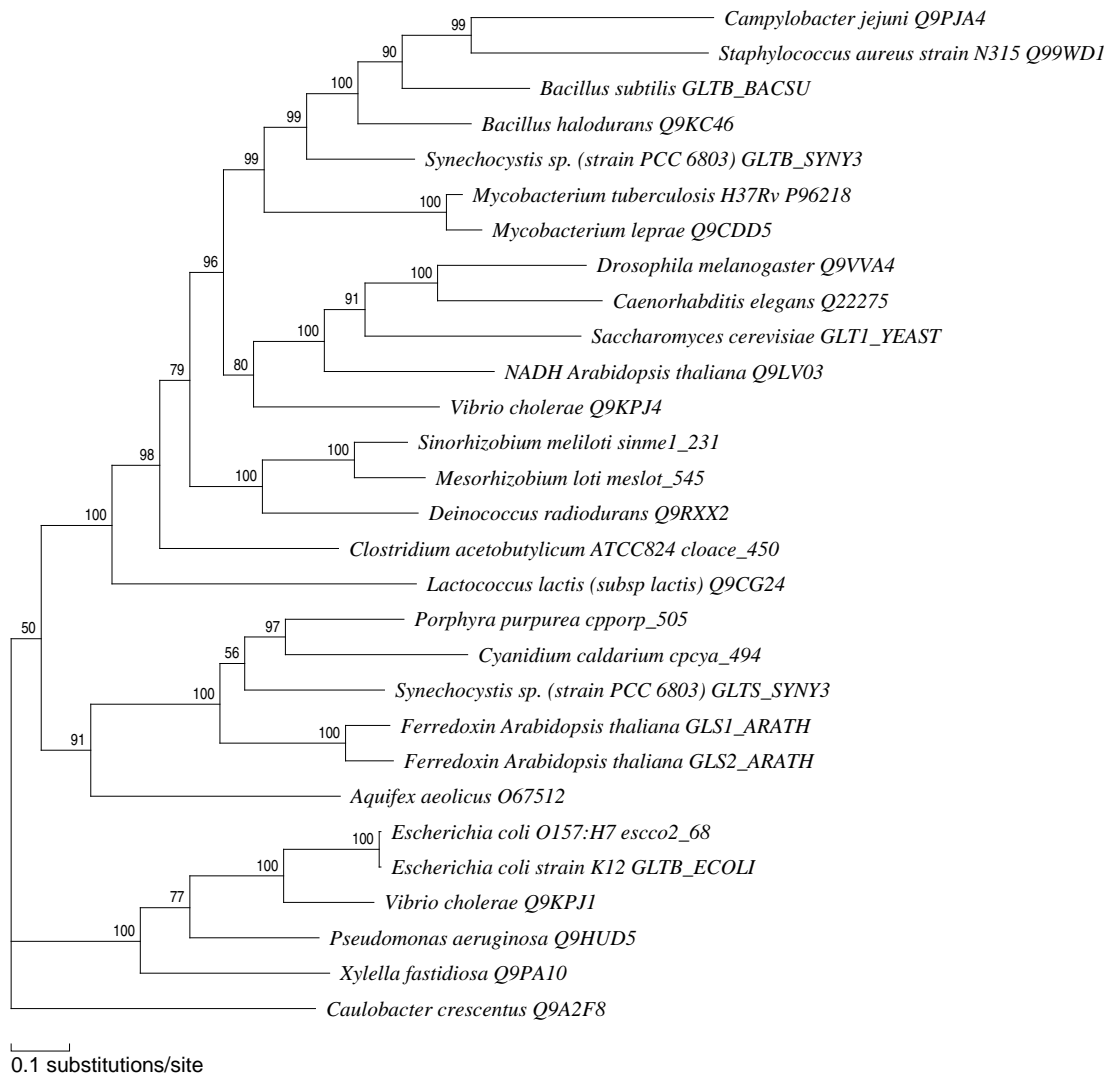


Abbildung A.3: Glutamatsynthase mit allen großen Untereinheiten, siehe Tabelle 3.1 Nr. 4 und 5

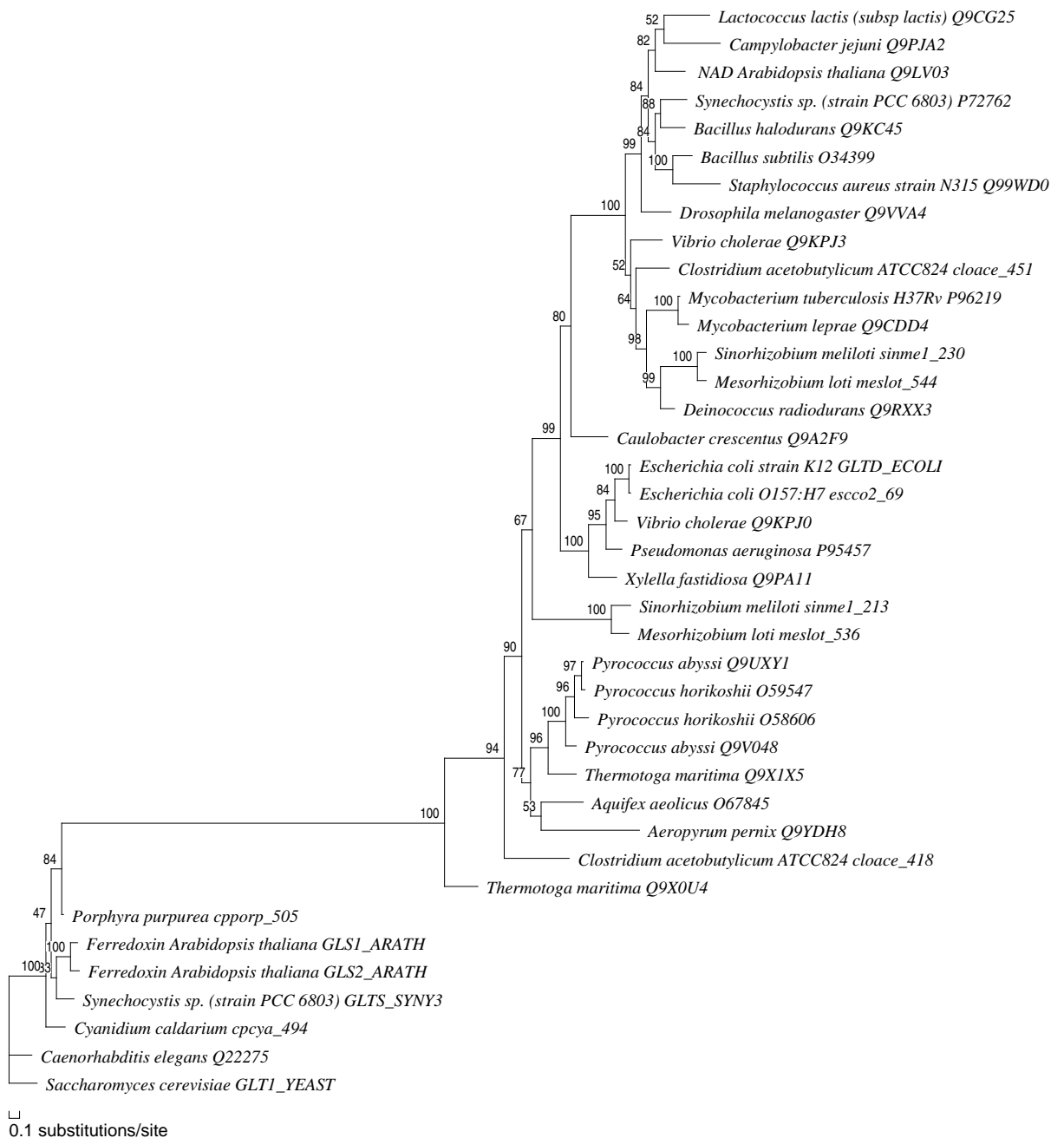


Abbildung A.4: Glutaminsynthase mit allen kleinen Untereinheiten, siehe Tabelle 3.1 Nr. 4 und 5



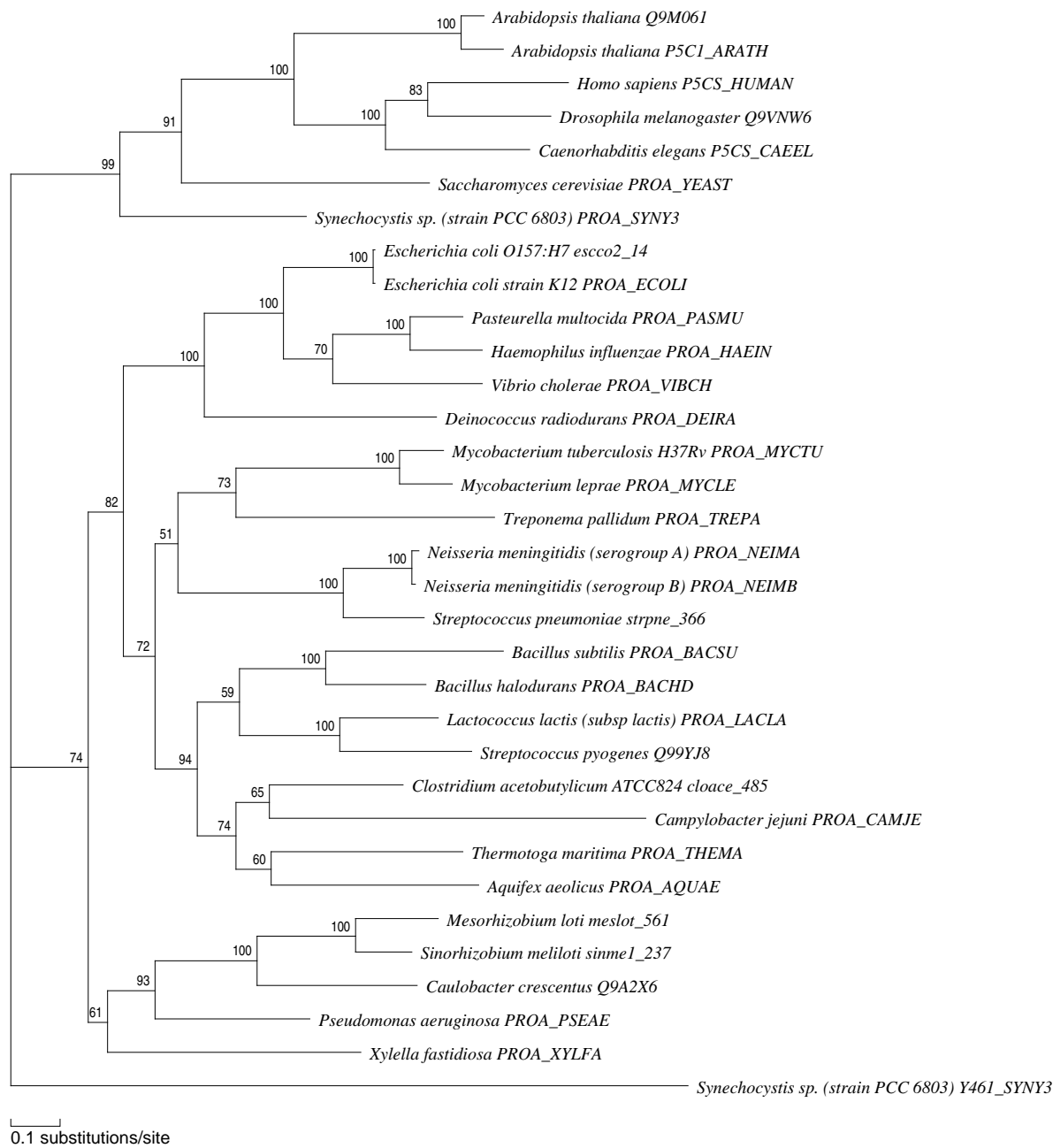
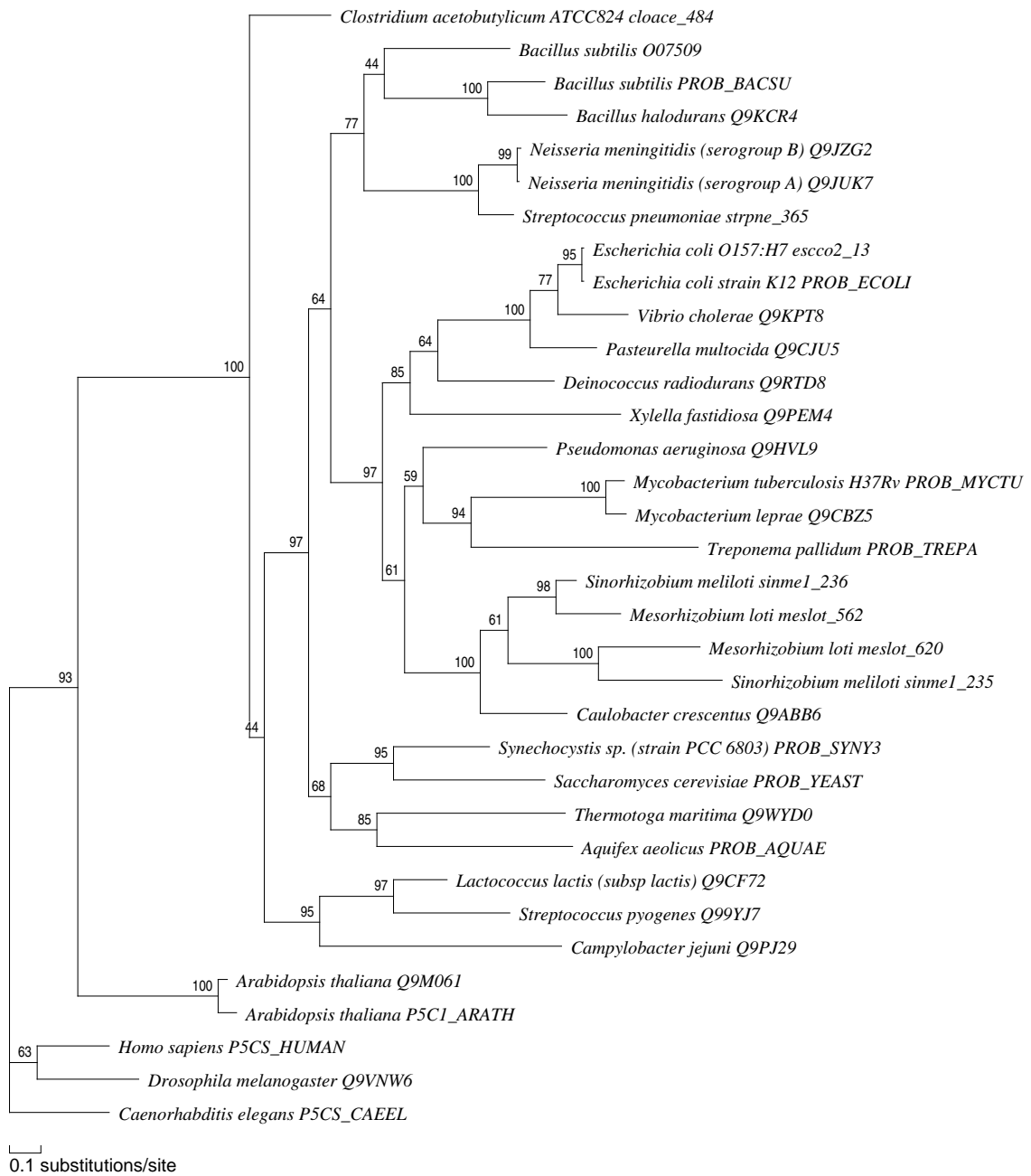
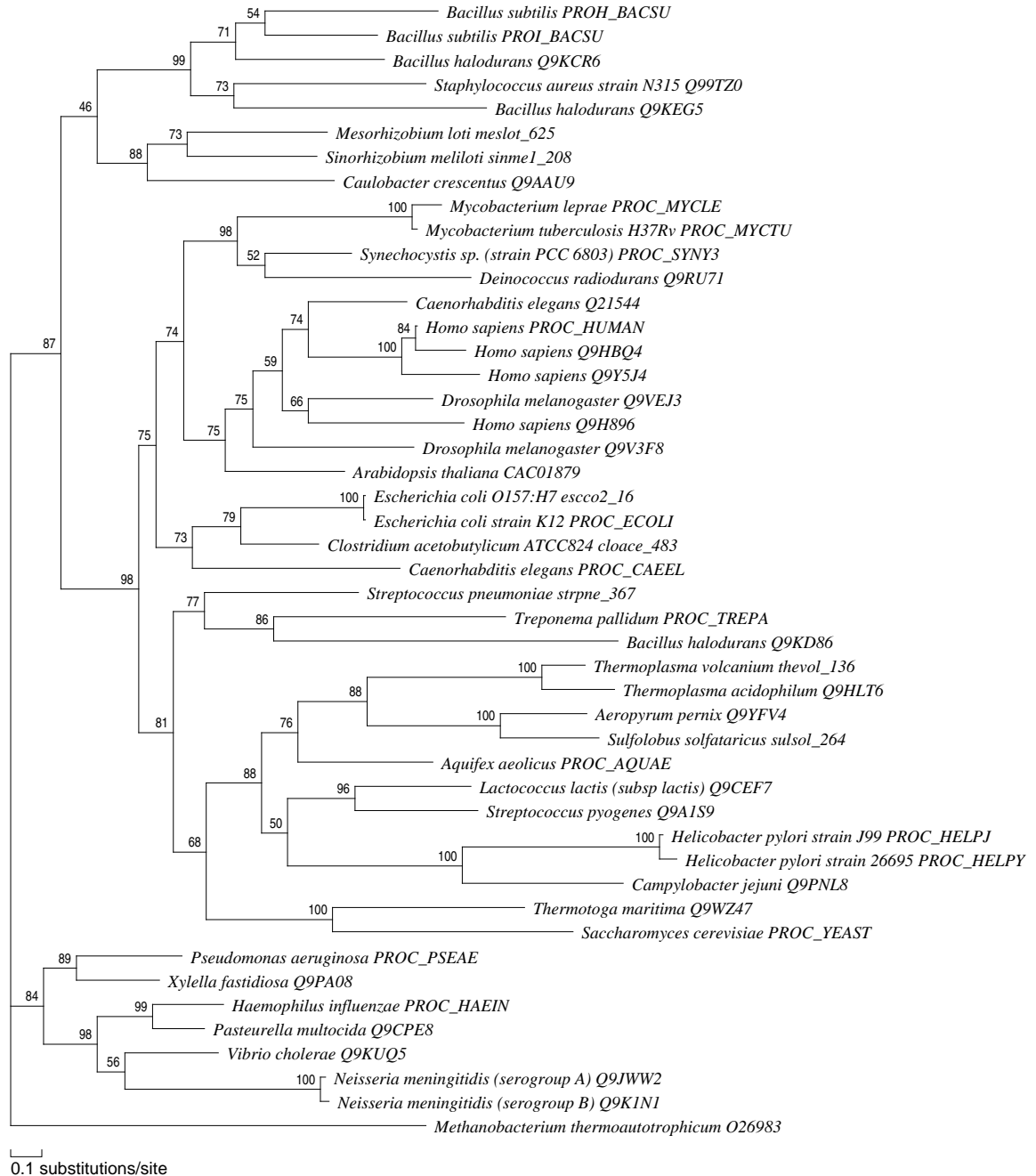
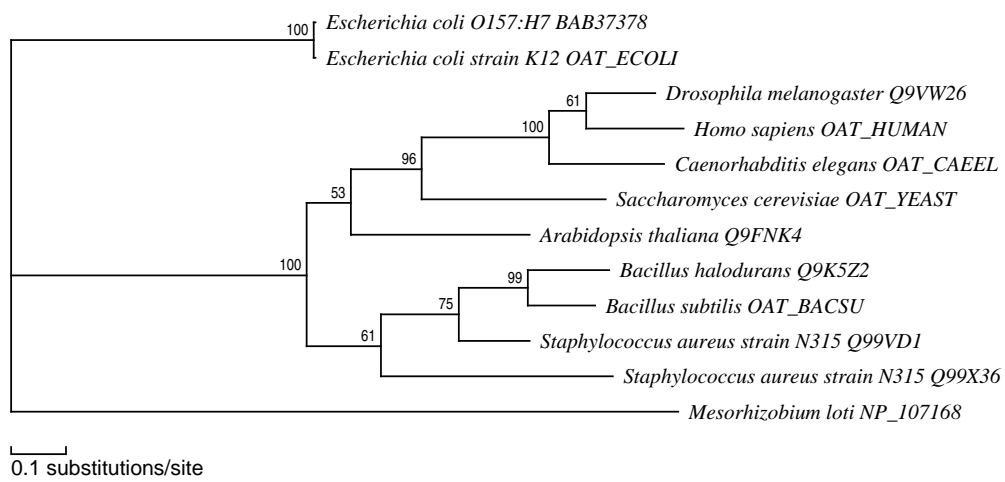


Abbildung A.5:  $\gamma$ -Glutamylkinase (*proA*), siehe Tabelle 3.1 Nr. 6

Abbildung A.6: Glutamatsemialdehydreduktase (*proB*), siehe Tabelle 3.1 Nr. 7

Abbildung A.7:  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylatoreductase (*proC*), siehe Tabelle 3.1 Nr. 8

Abbildung A.8:  $\delta$ -Ornithinaminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 9

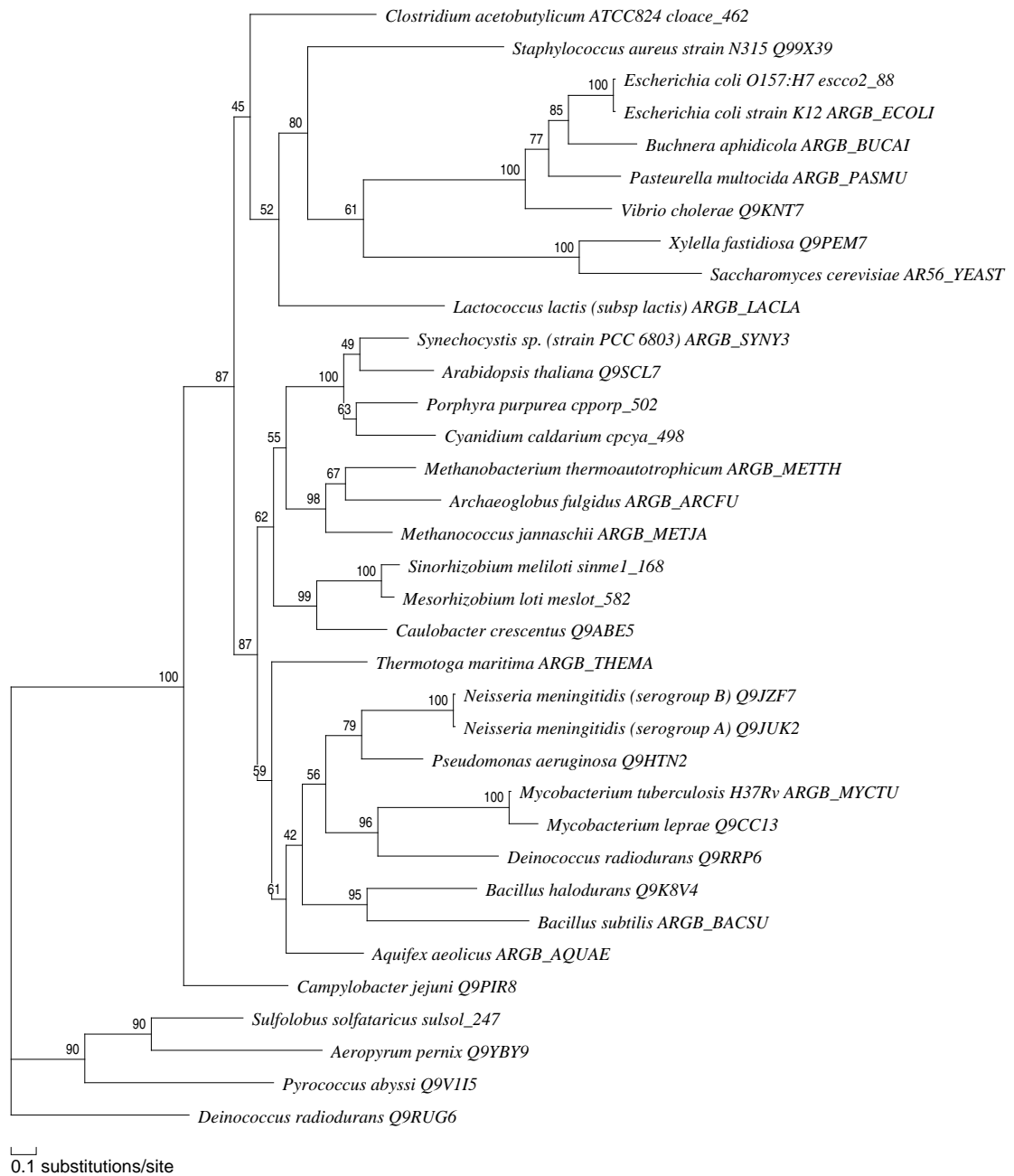


Abbildung A.9: N-Acetylglutamatkinase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 10

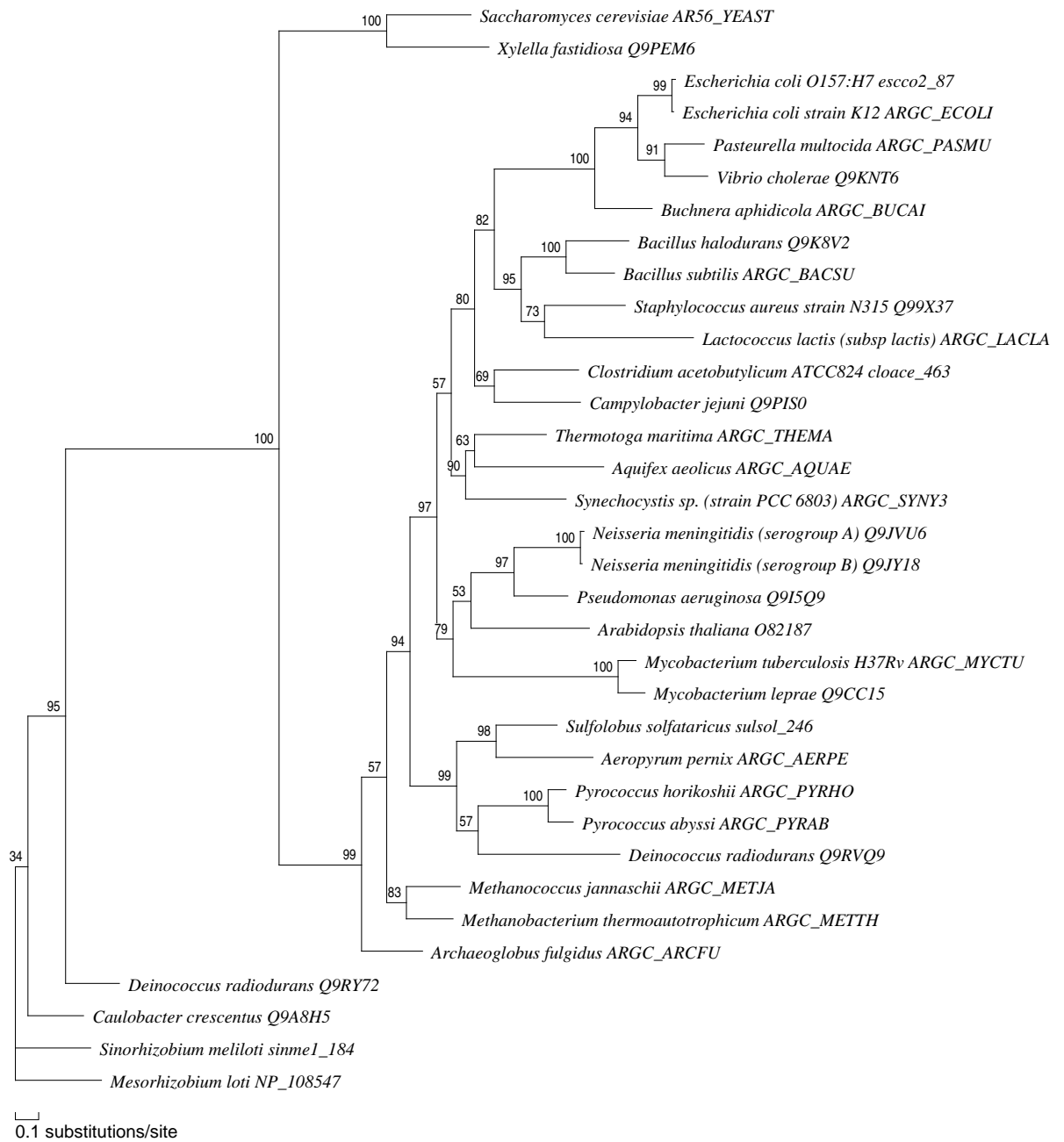


Abbildung A.10: N-Acetylglutamatsemialdehydreduktase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 11

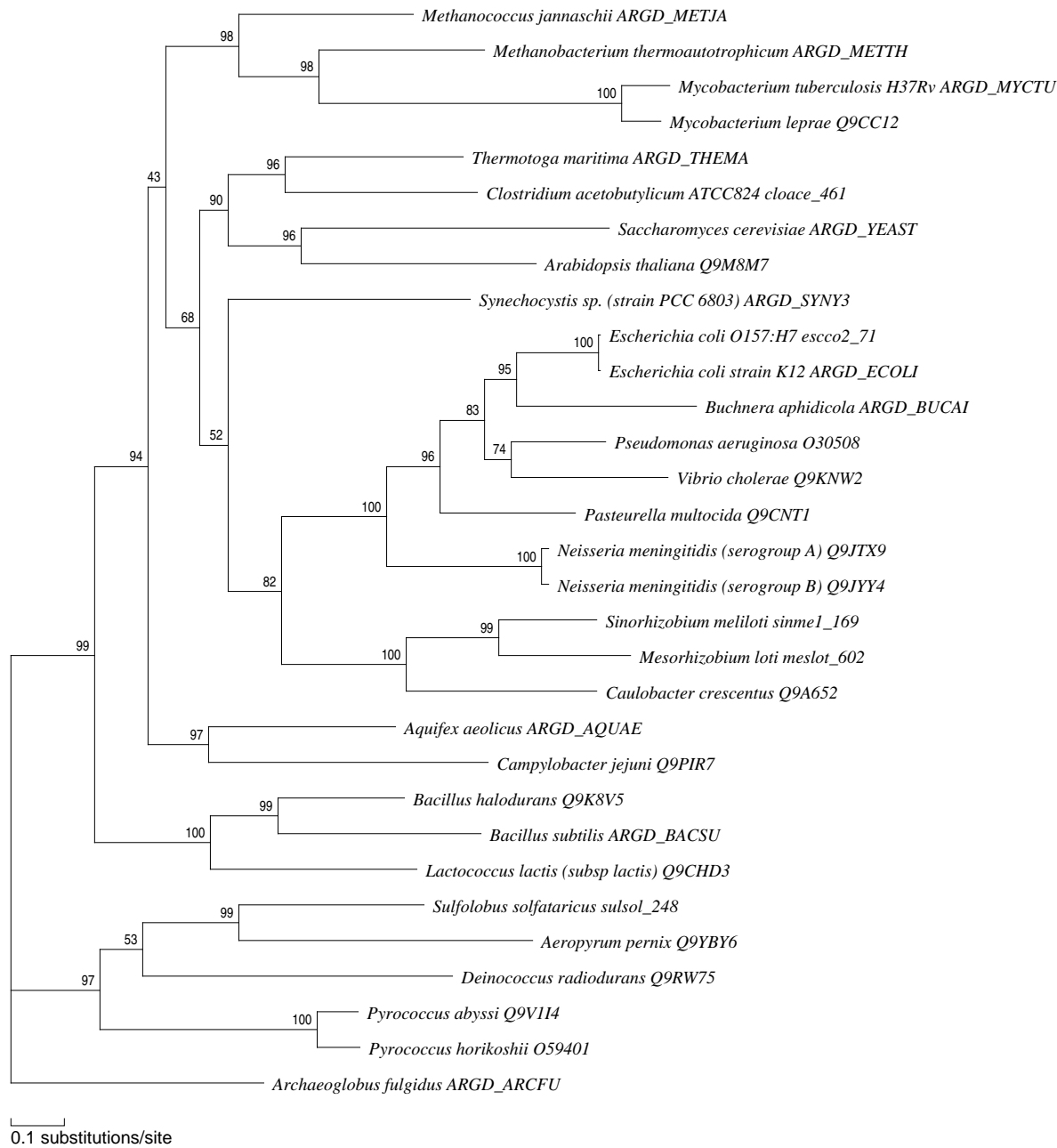


Abbildung A.11: Acetylornithin-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 12

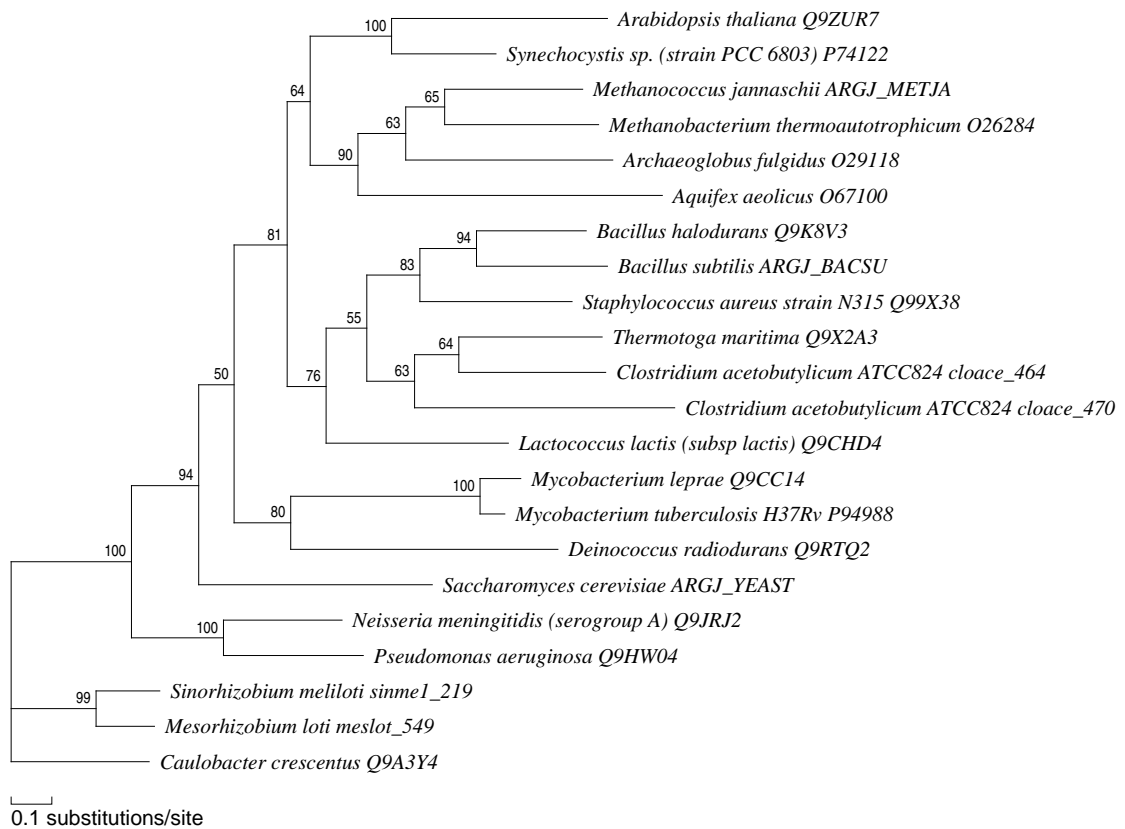


Abbildung A.12: Ornithinacetyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 13



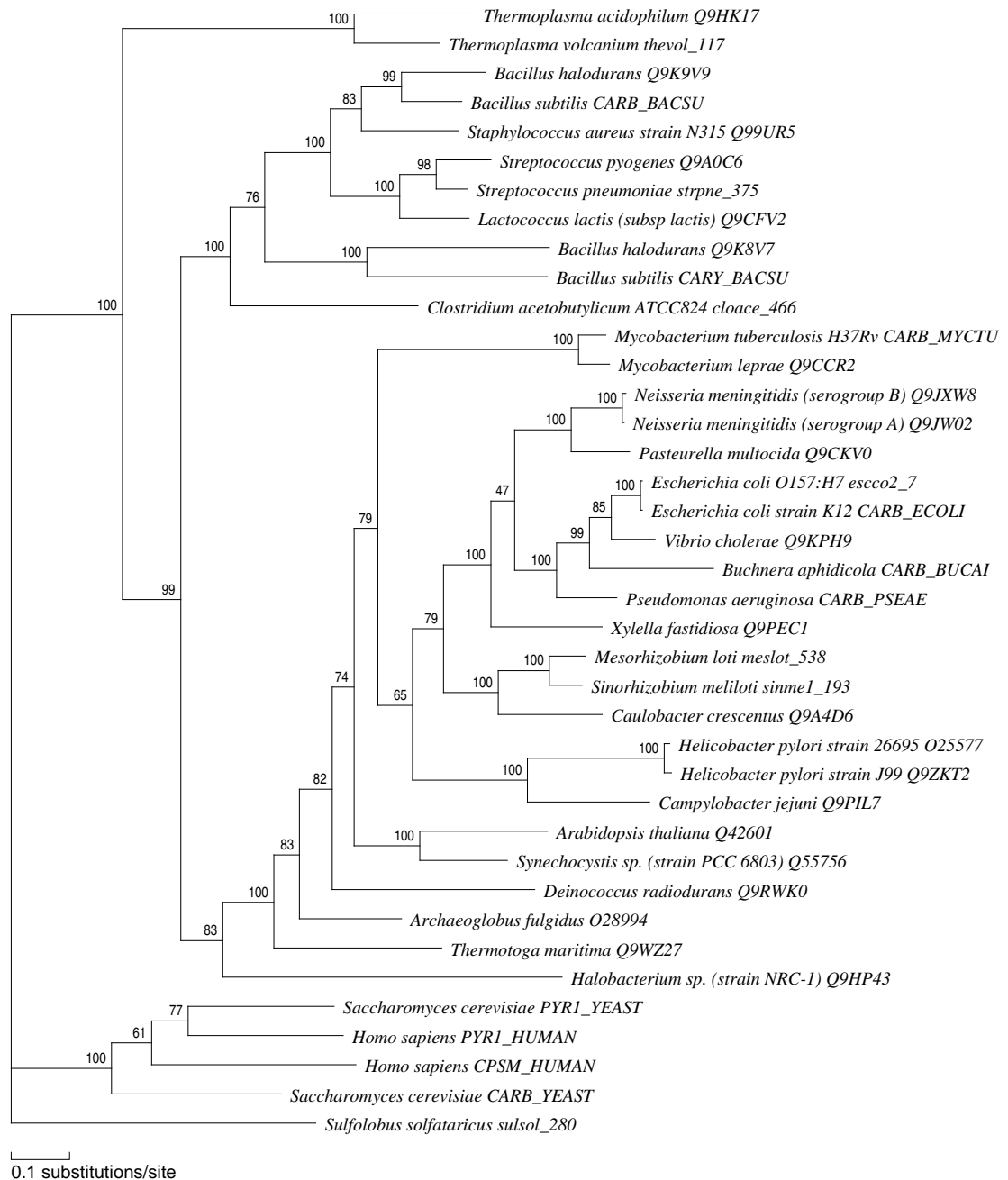


Abbildung A.13: Carbamoylphosphatase, große Untereinheit, siehe Tabelle 3.1 Nr. 14

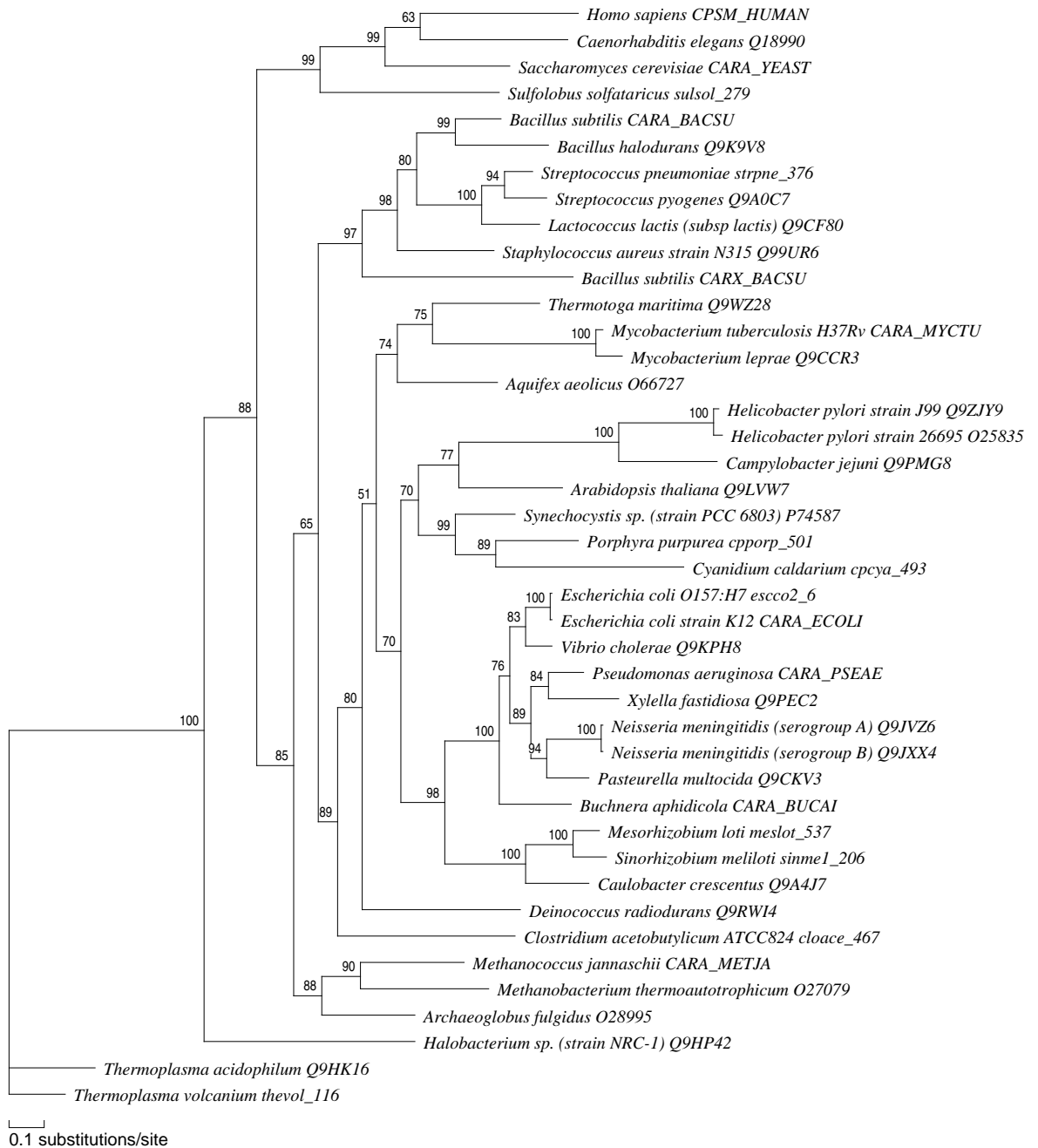


Abbildung A.14: Carbamoylphosphat synthase, kleine Untereinheit, siehe Tabelle 3.1 Nr. 15

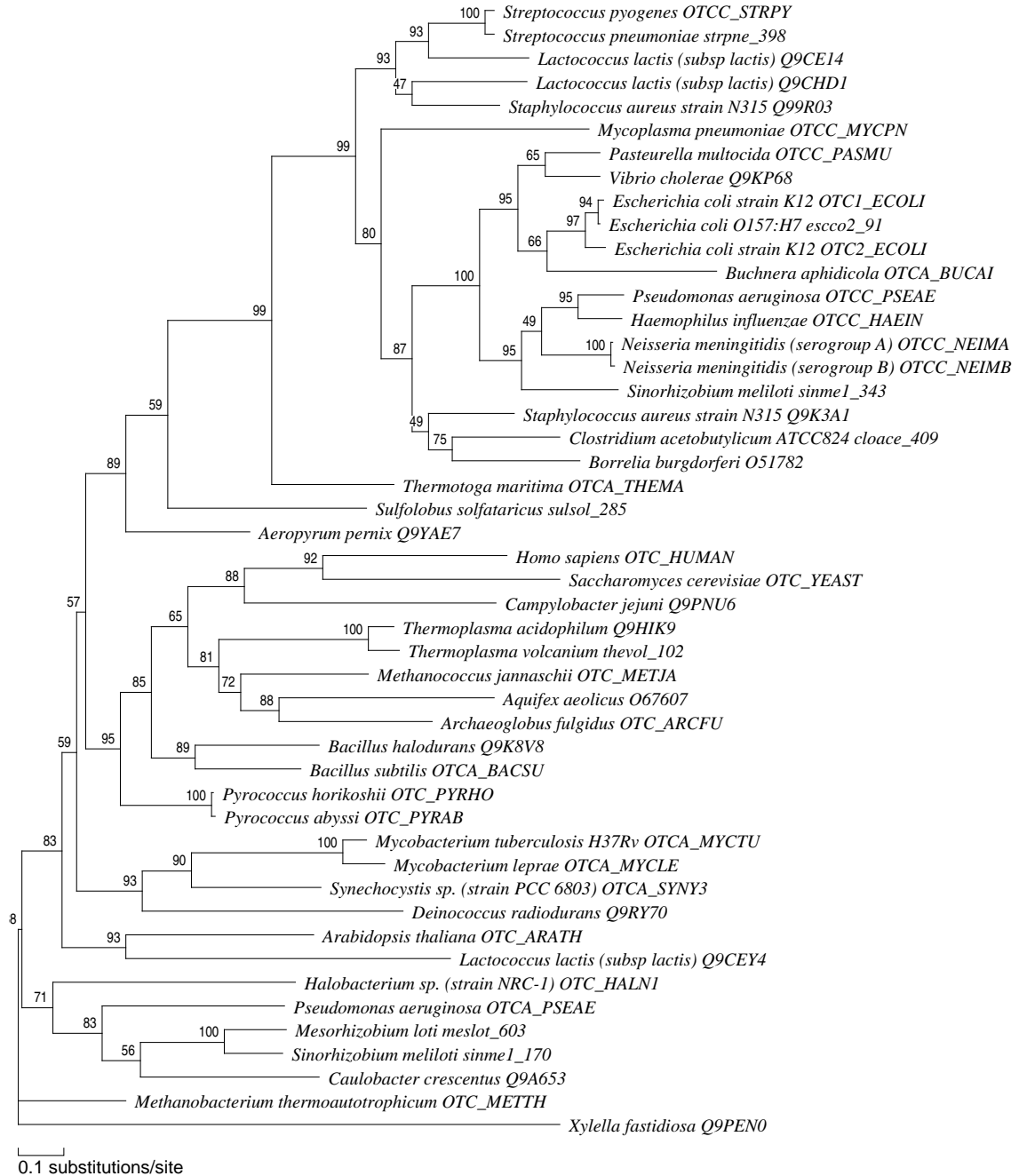


Abbildung A.15: Ornithincarbamoyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 16

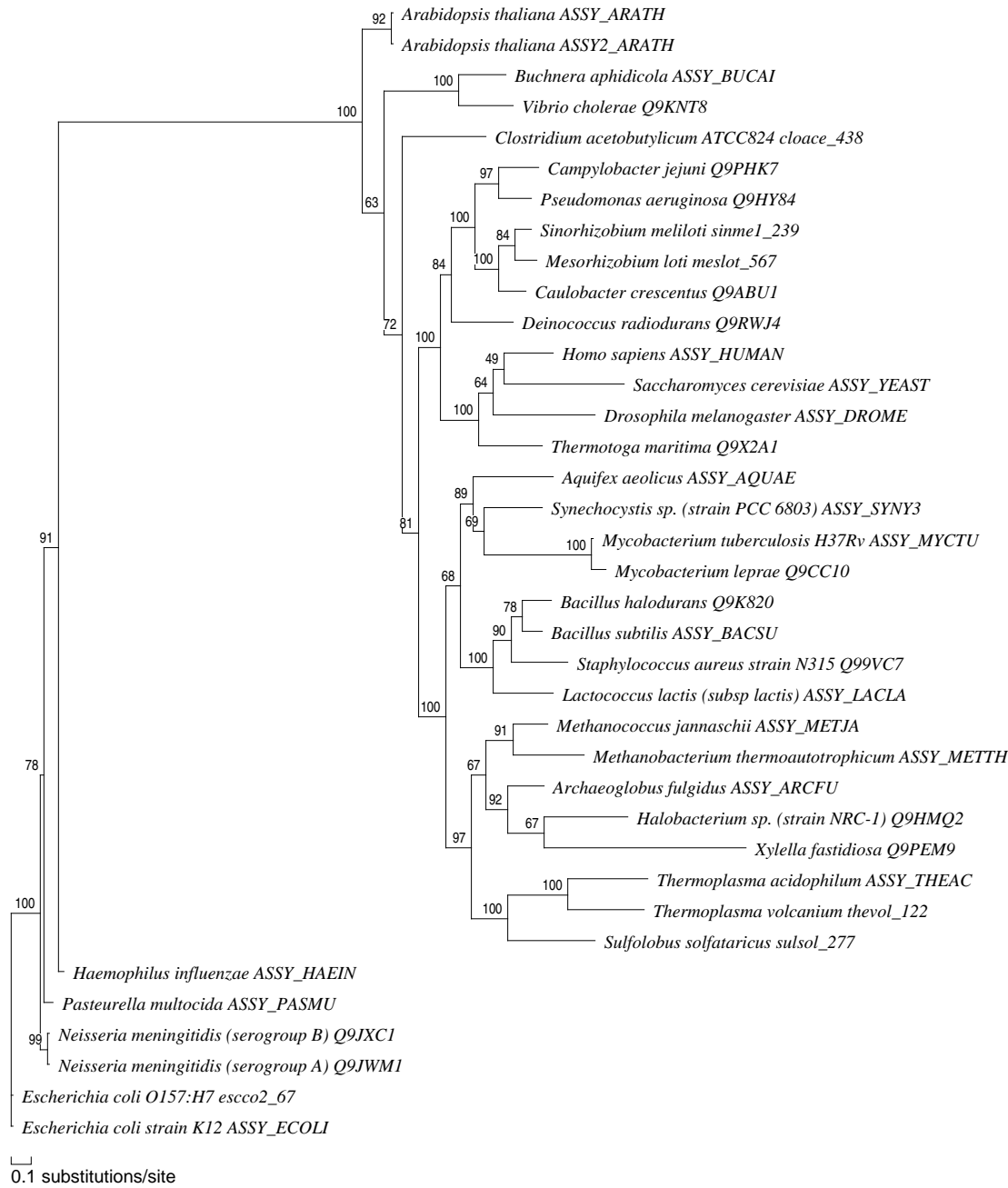


Abbildung A.16: Argininosuccinatsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 17

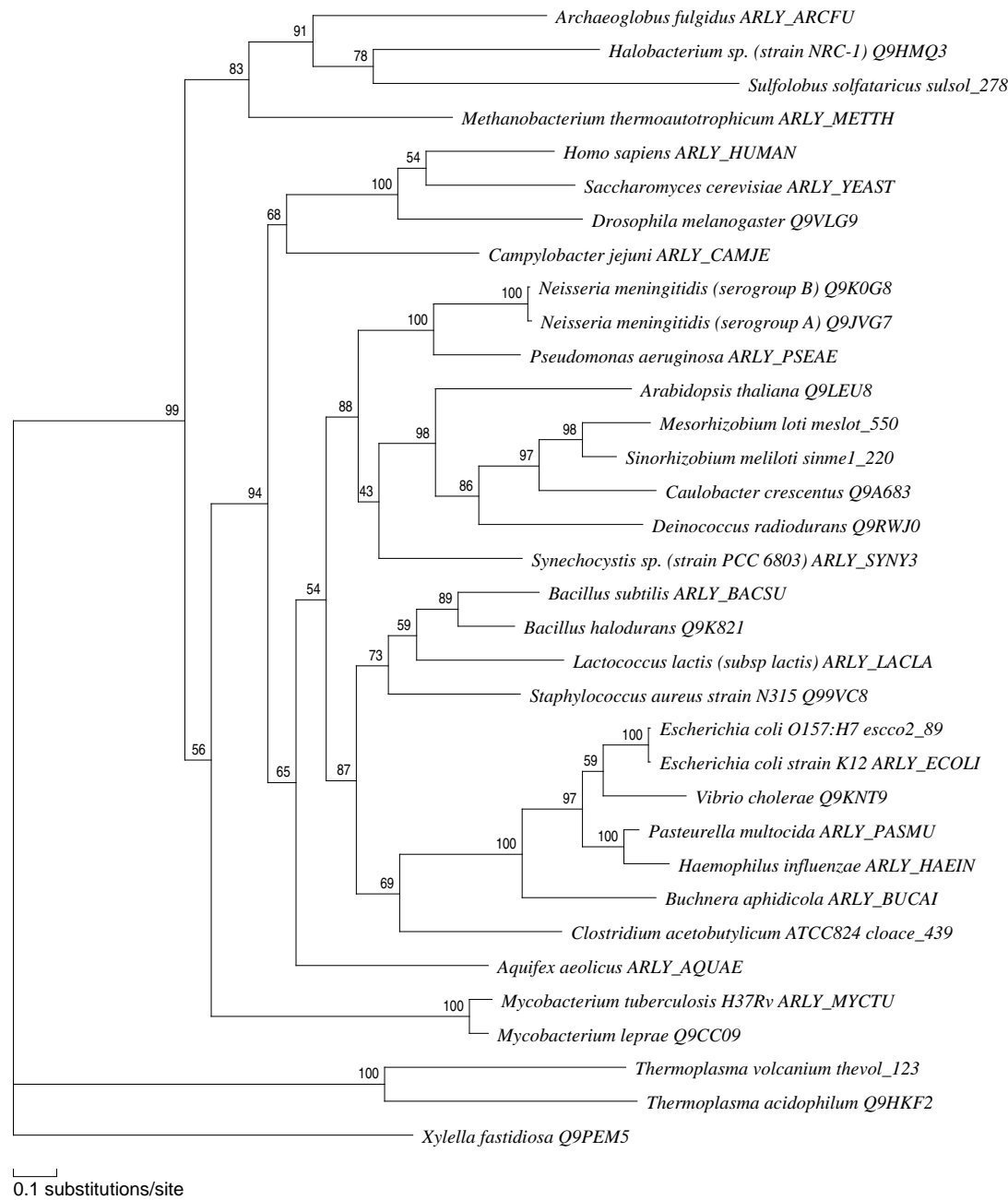


Abbildung A.17: Argininosuccinatyase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 18

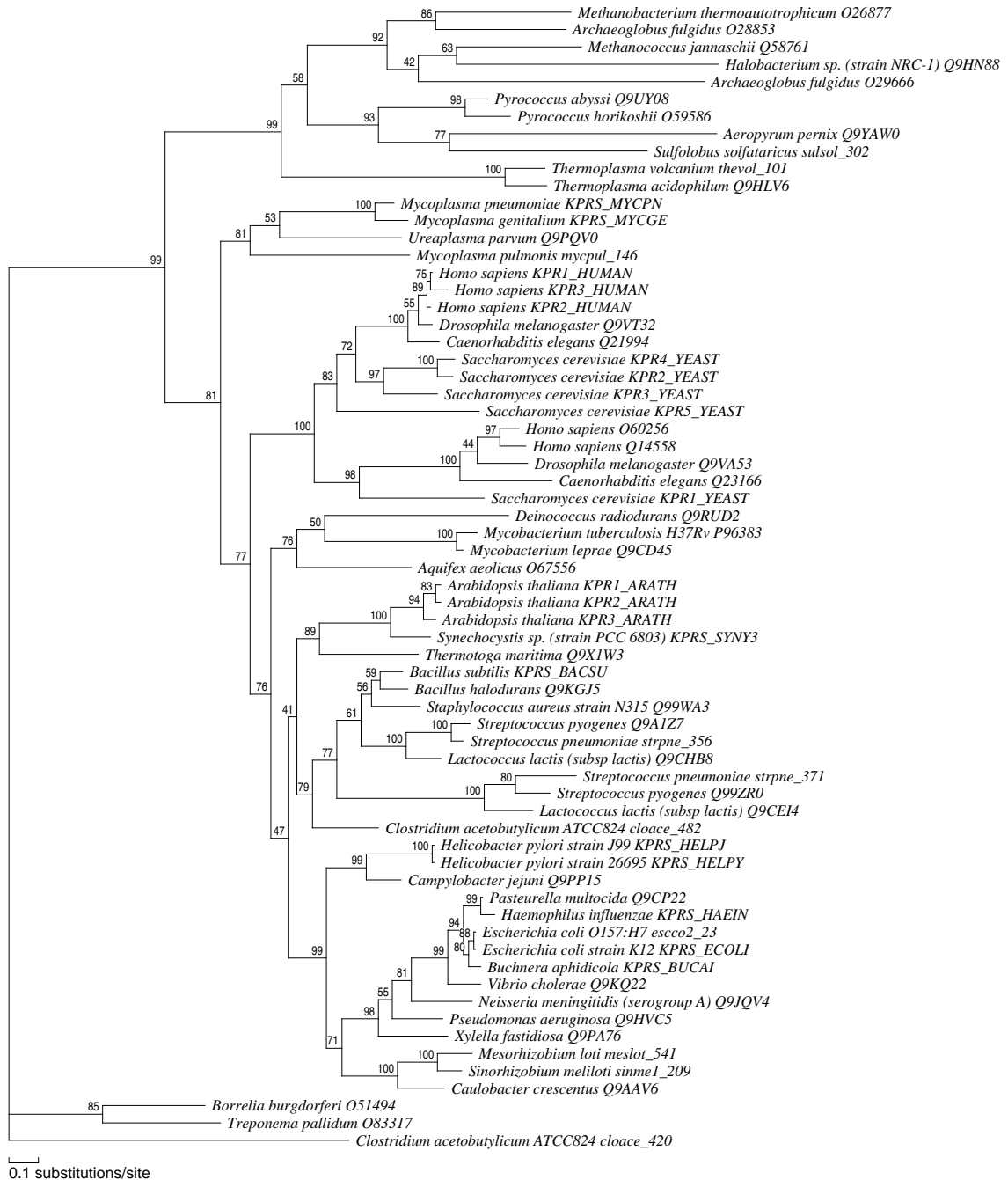


Abbildung A.18: Ribosepyrophosphokinase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 19

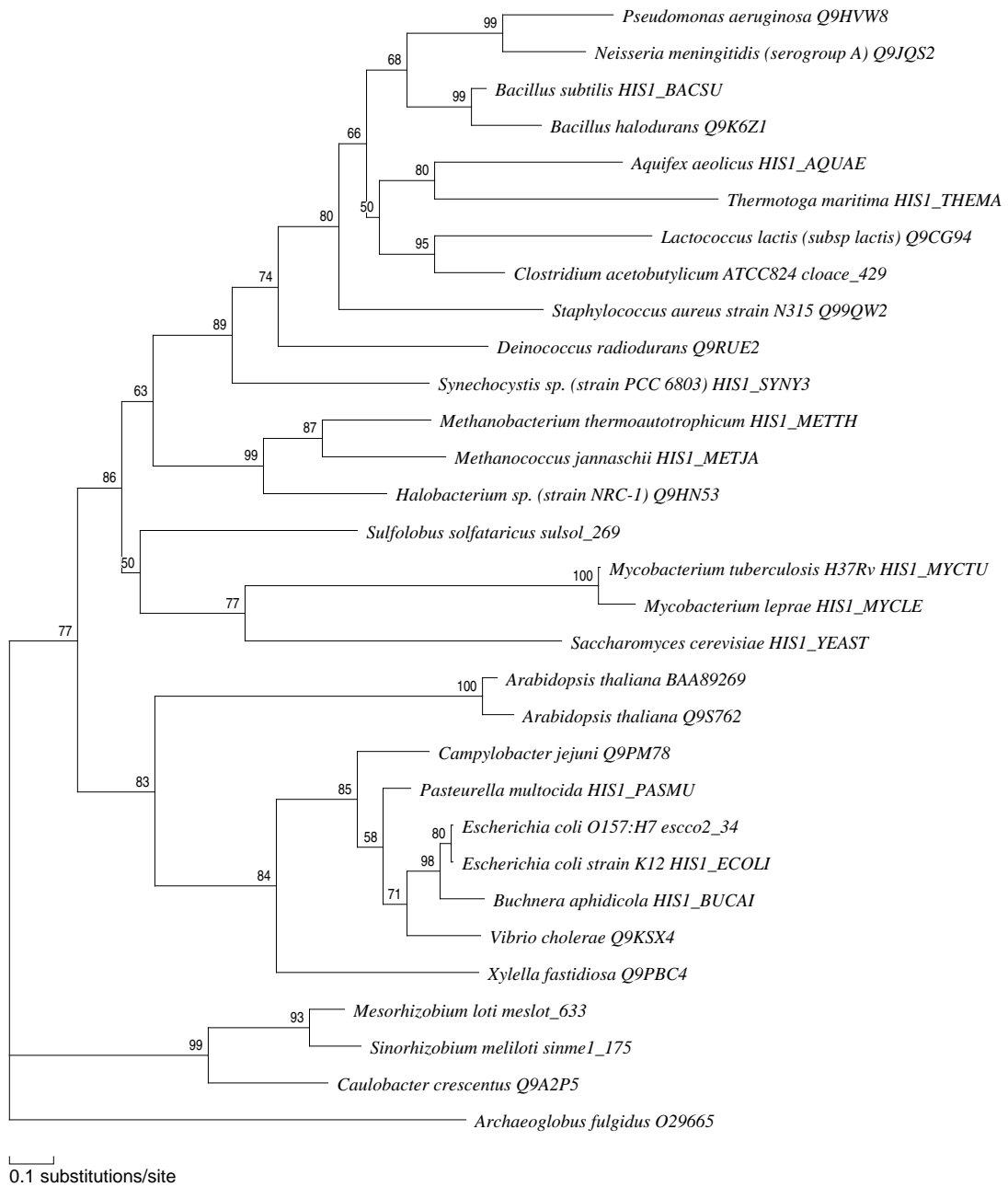


Abbildung A.19: ATP-Phosphoribosyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 20

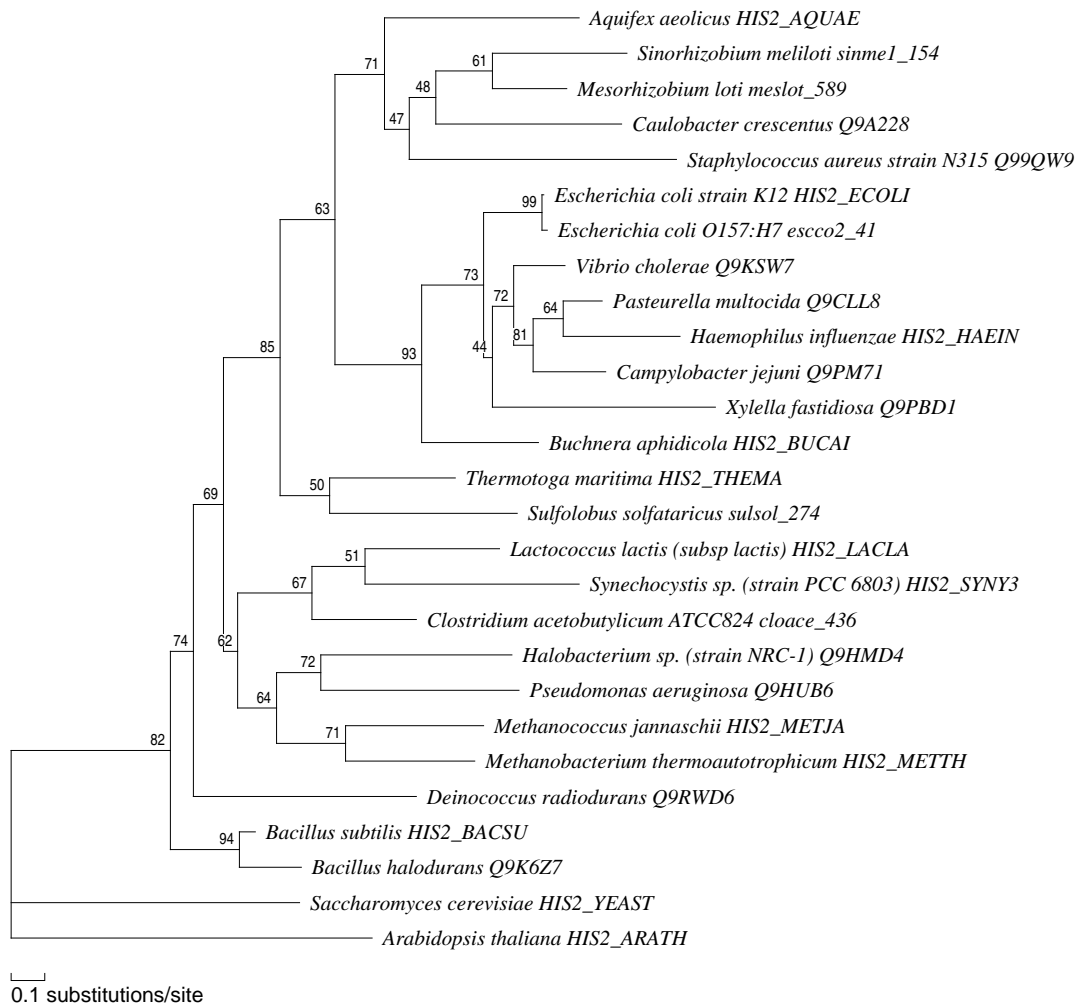


Abbildung A.20: Phosphoribosyl-ATP-Pyrophosphohydrolase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 21



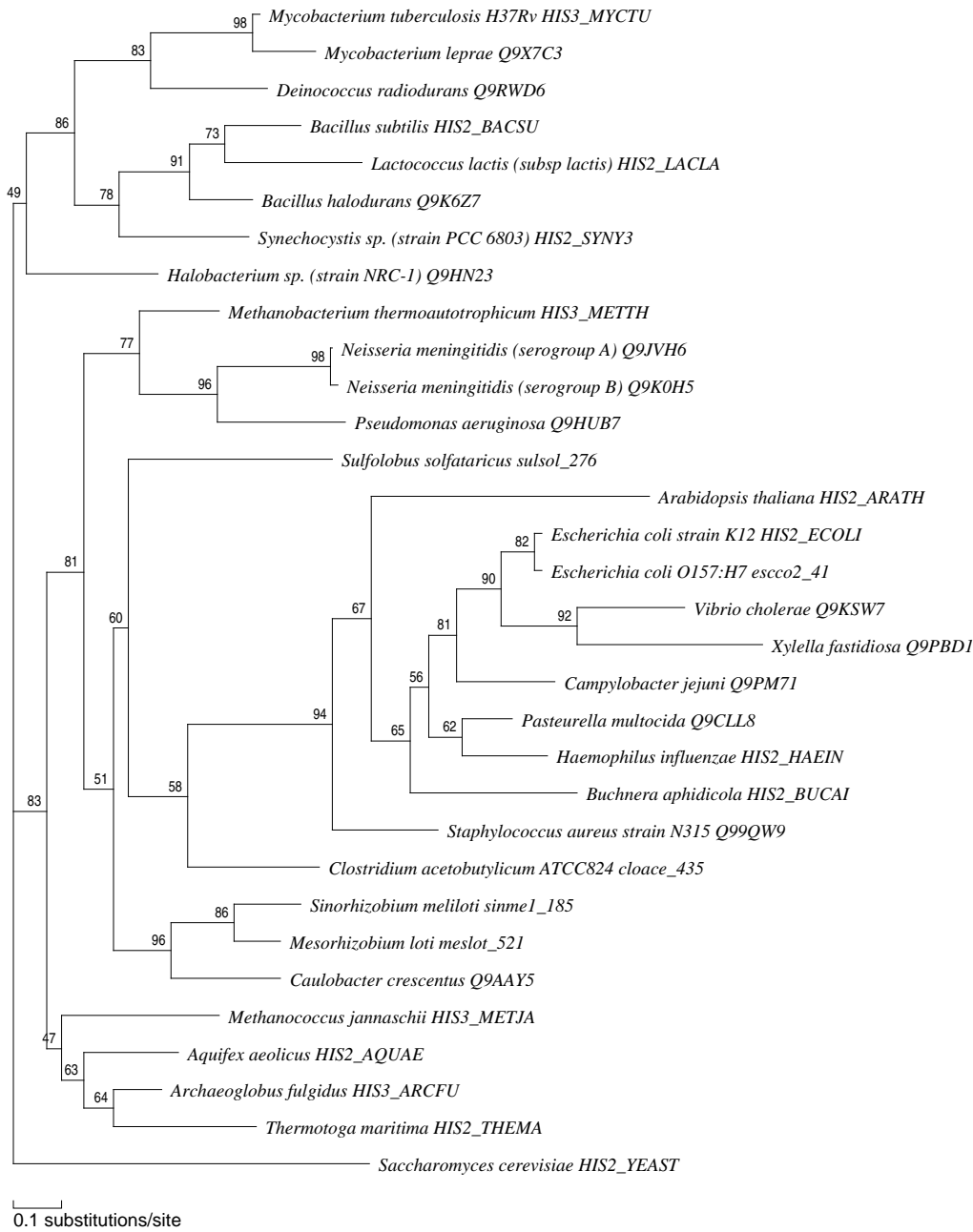


Abbildung A.21: Phosphoribosyl-ATP-Cyclohydrolase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 22

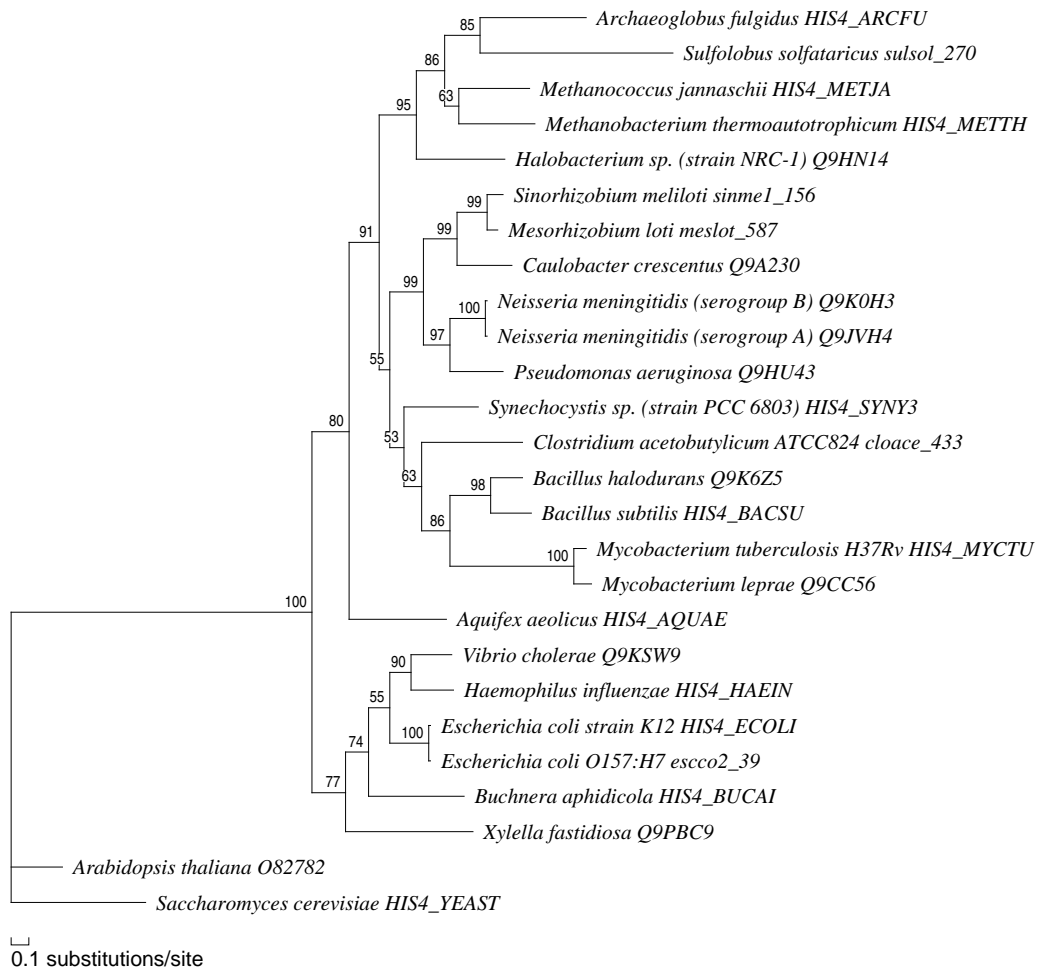


Abbildung A.22: BBM-II-Isomerase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 23

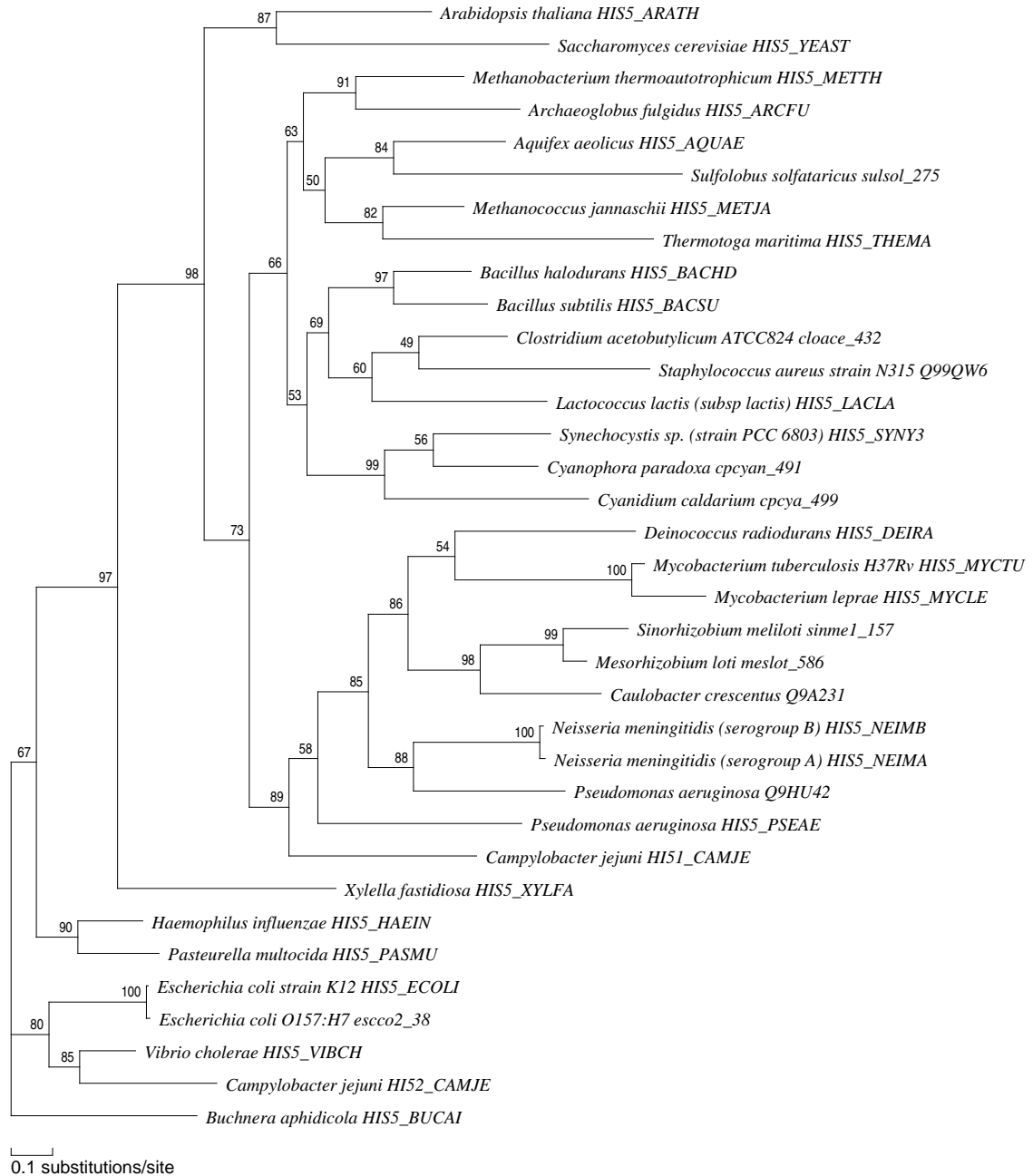


Abbildung A.23: N-Terminus der Imidazoglyceratphosphat-Synthetase: Glutamin-Amidotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 24

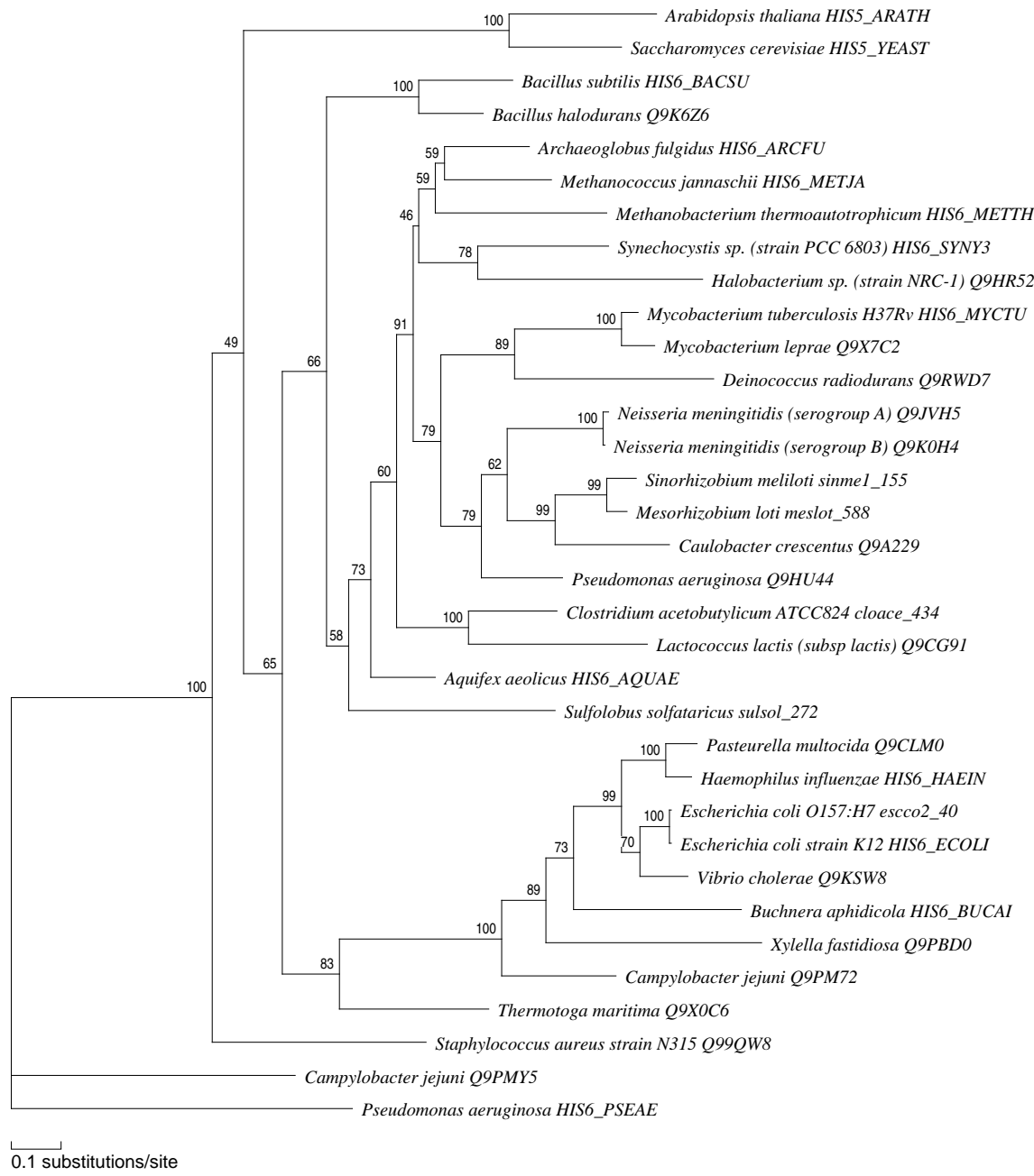


Abbildung A.24: C-Terminus der Imidazoglyceratphosphat-Synthetase: Cyclase, siehe Tabelle 3.1  
Nr. 25

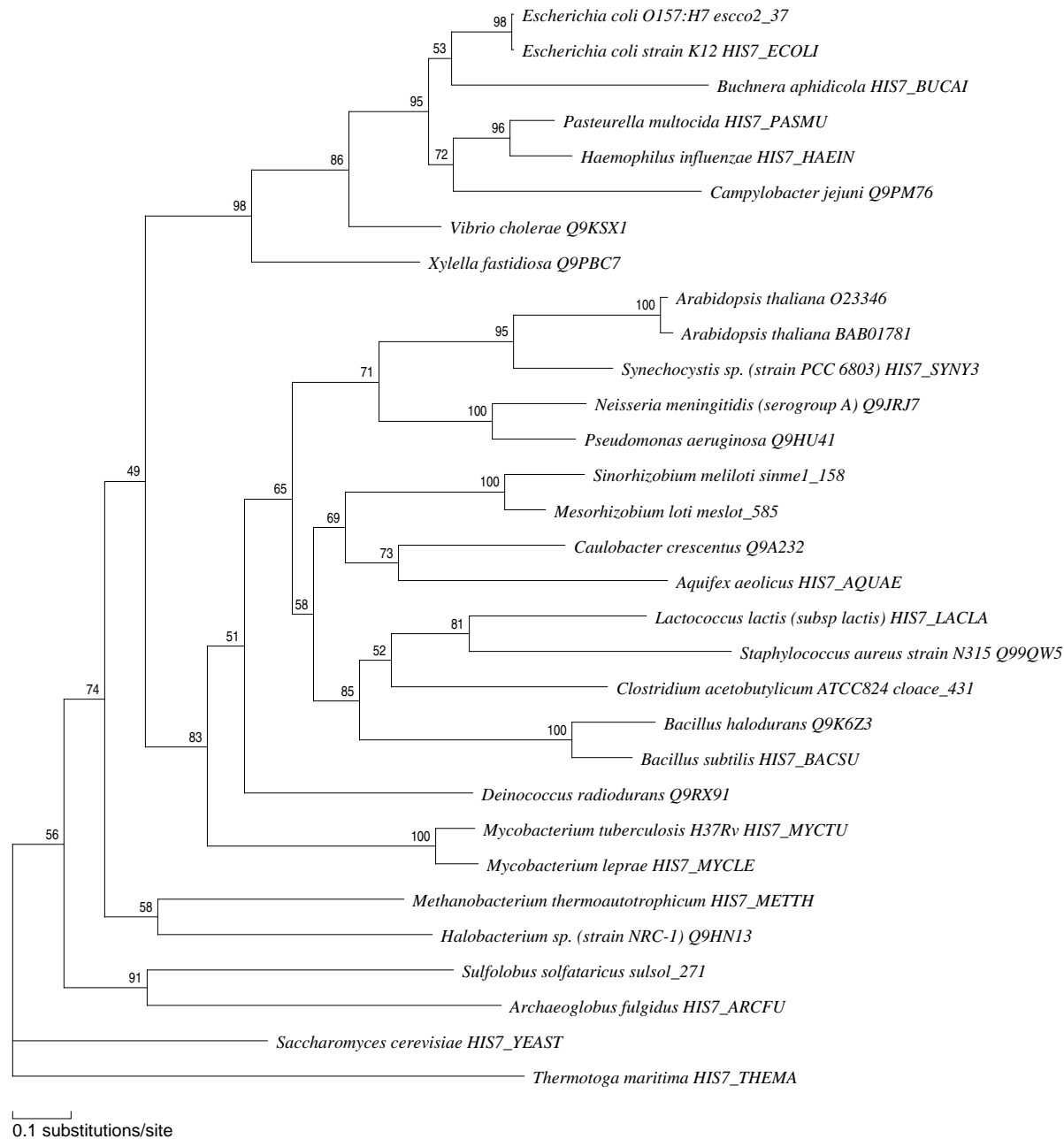


Abbildung A.25: Imidazolglycerolphosphatdehydratase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 26

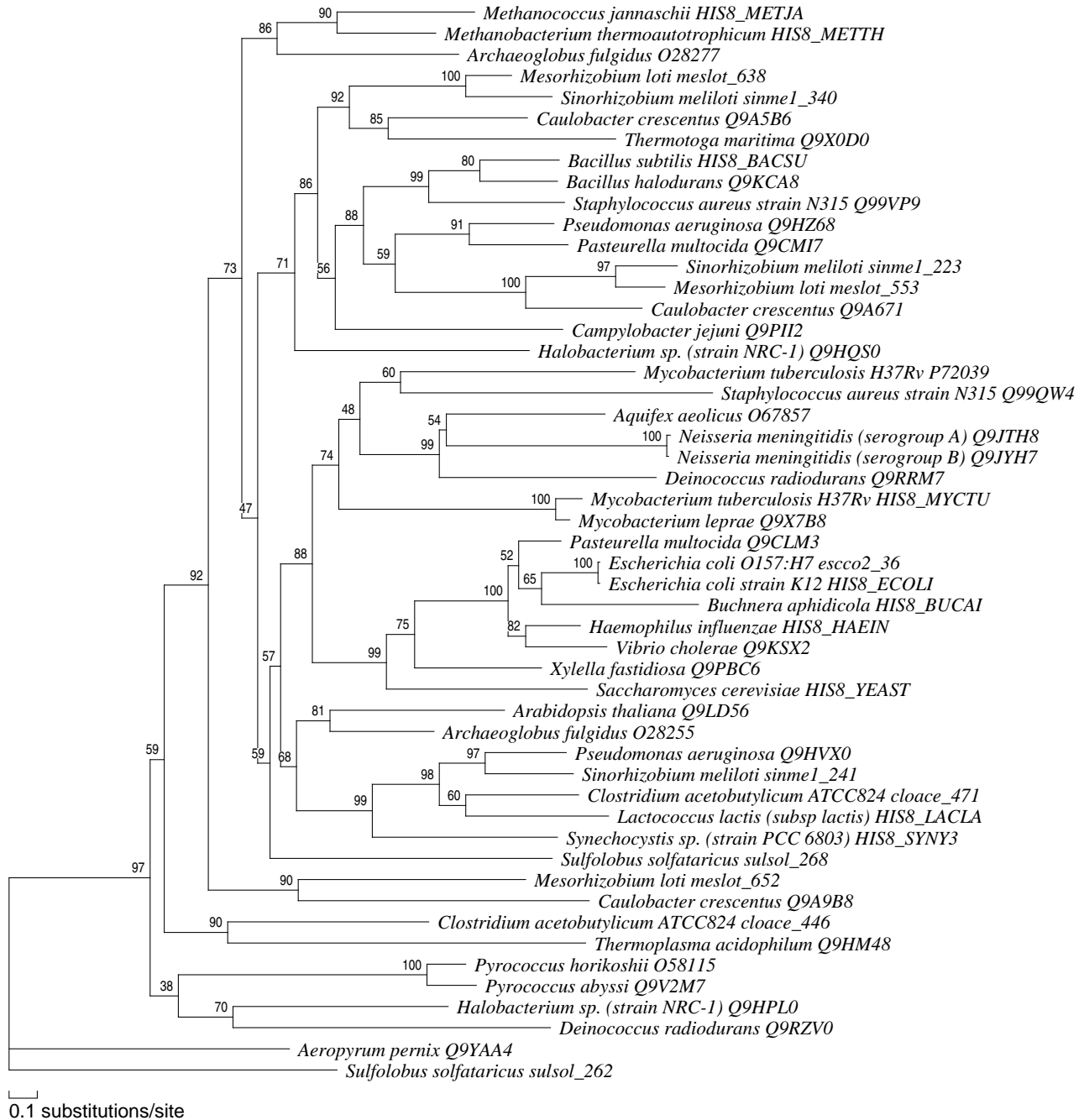


Abbildung A.26: Histidinolphosphat-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 27

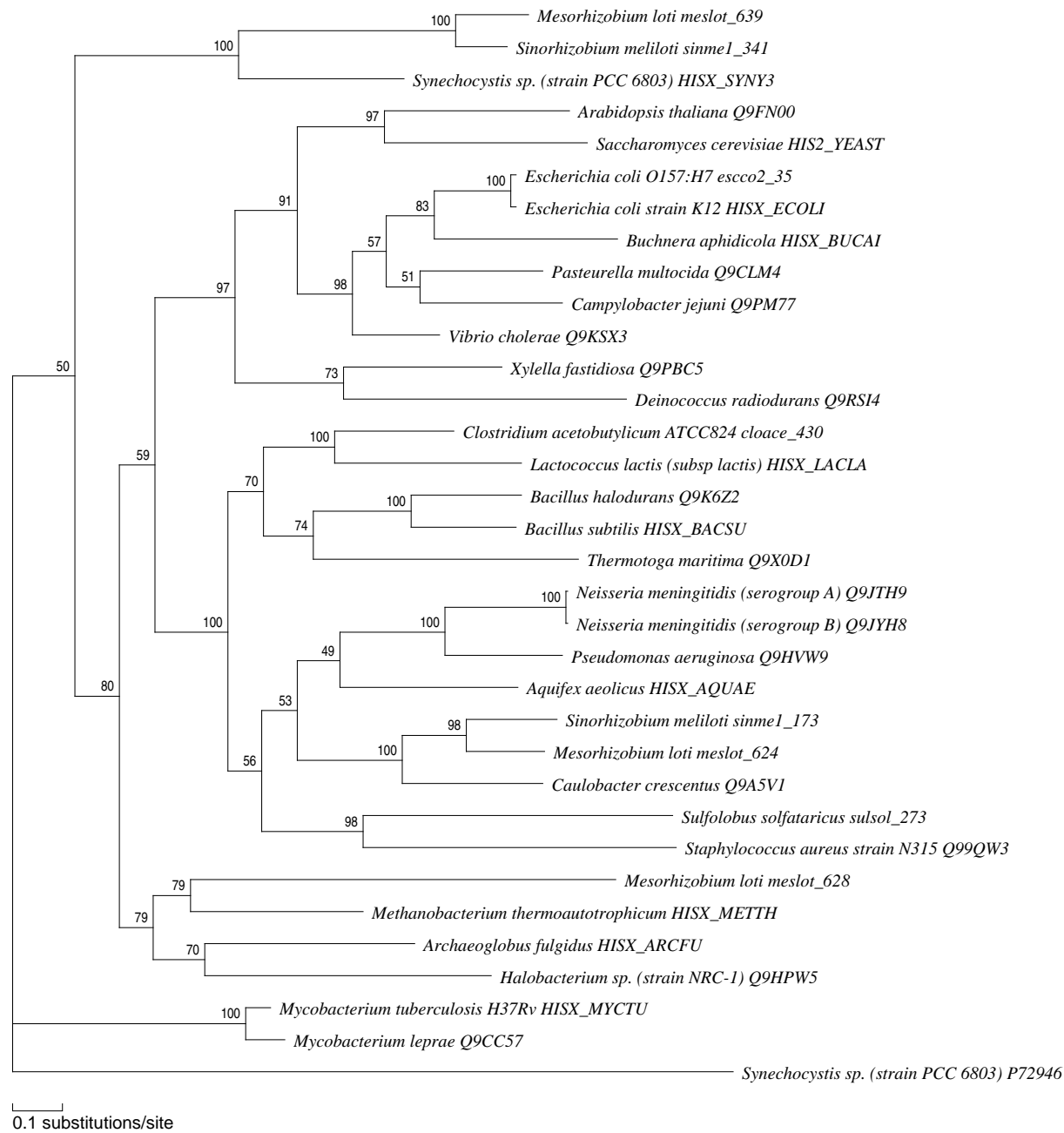


Abbildung A.27: Histidinoldehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 28

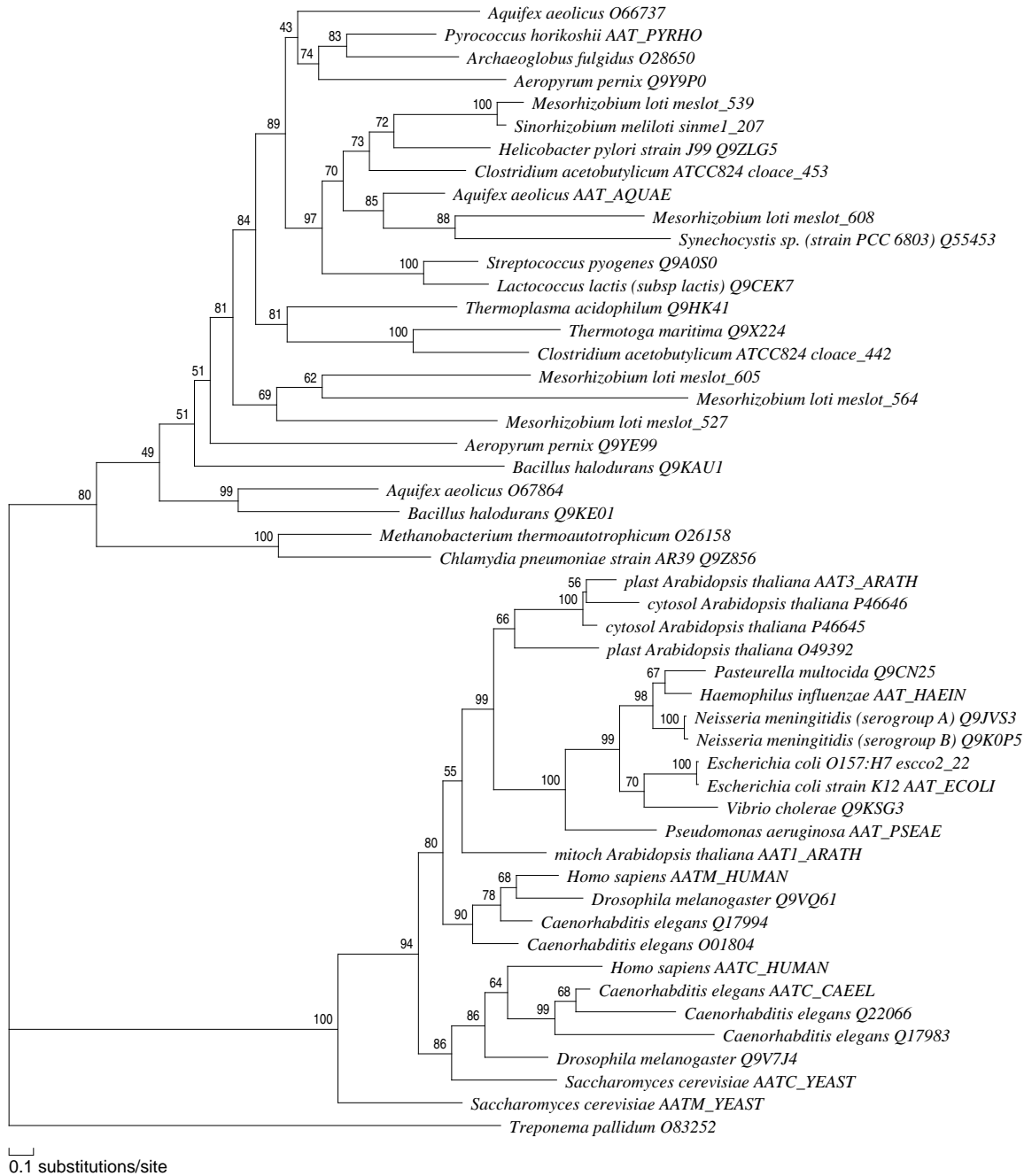


Abbildung A.28: Aspartat-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 29



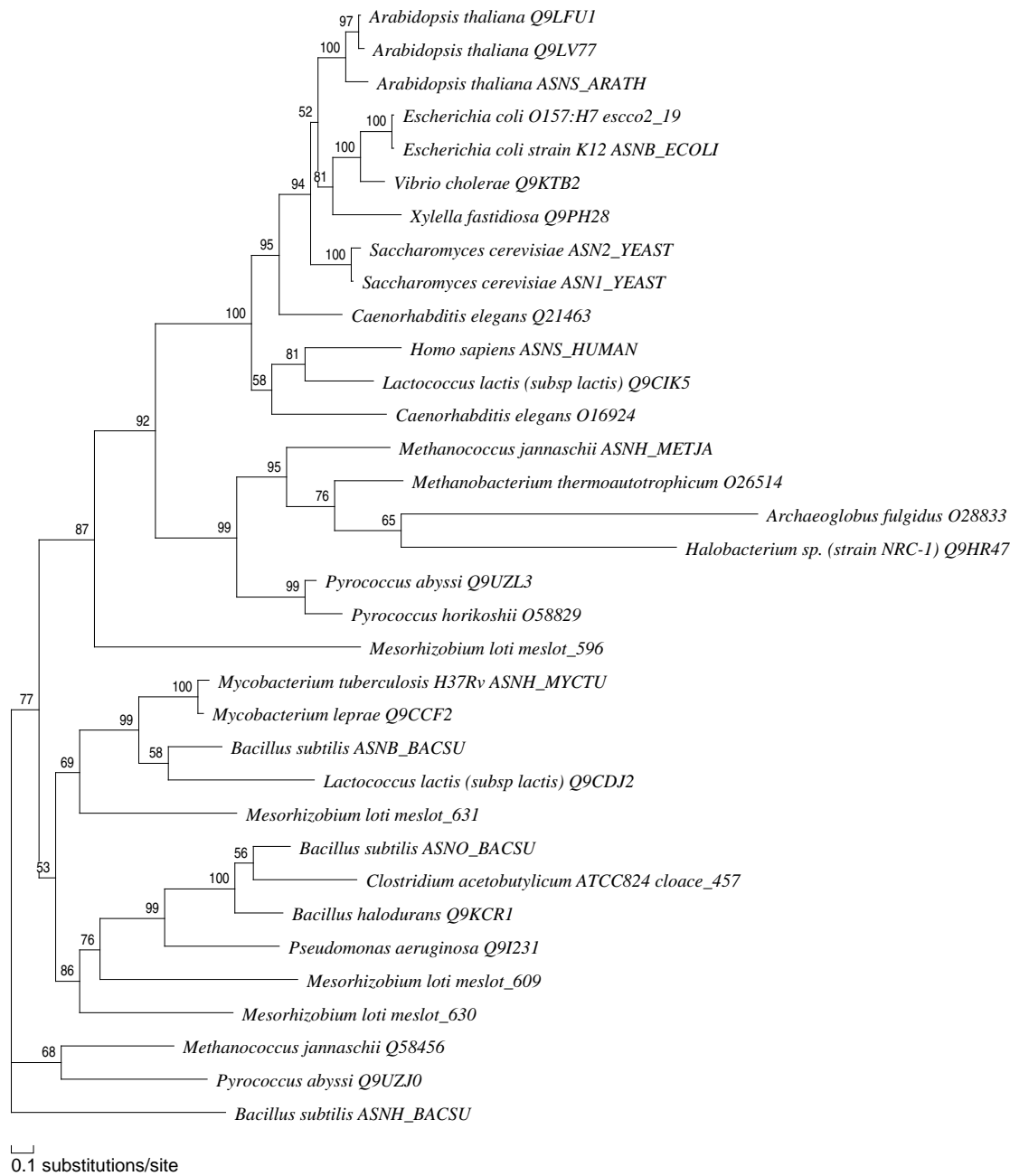


Abbildung A.29: Asparaginsynthetase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 30

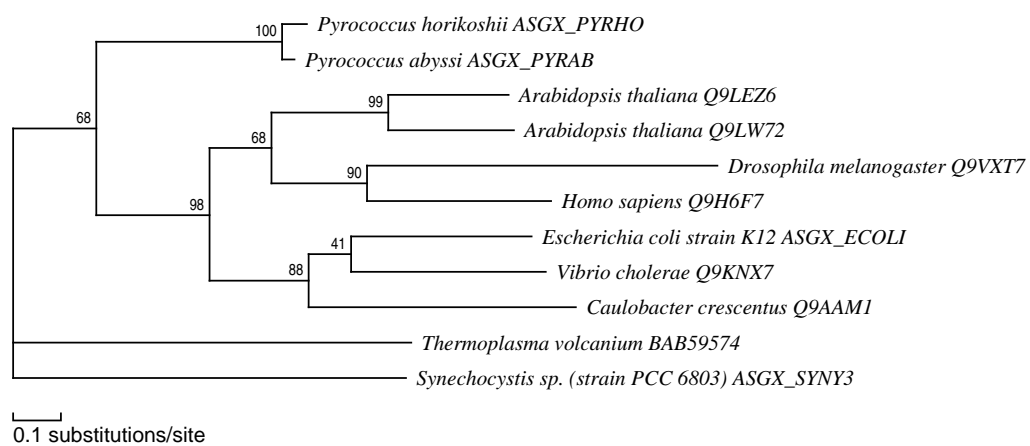


Abbildung A.30: Asparaginsynthetase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 31

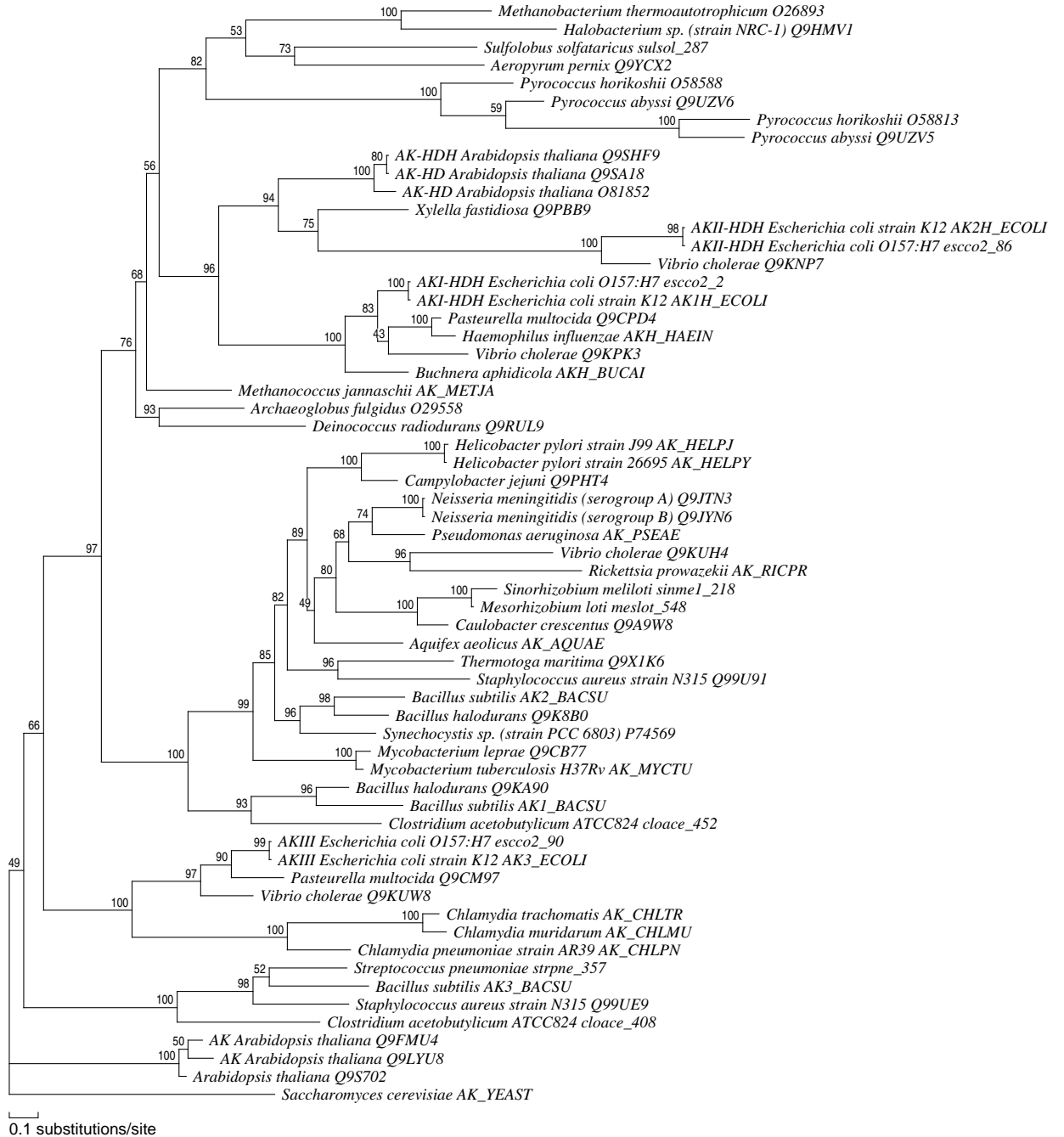


Abbildung A.31: monofunktionelle und bifunktionelle Aspartakinase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 32 und 33

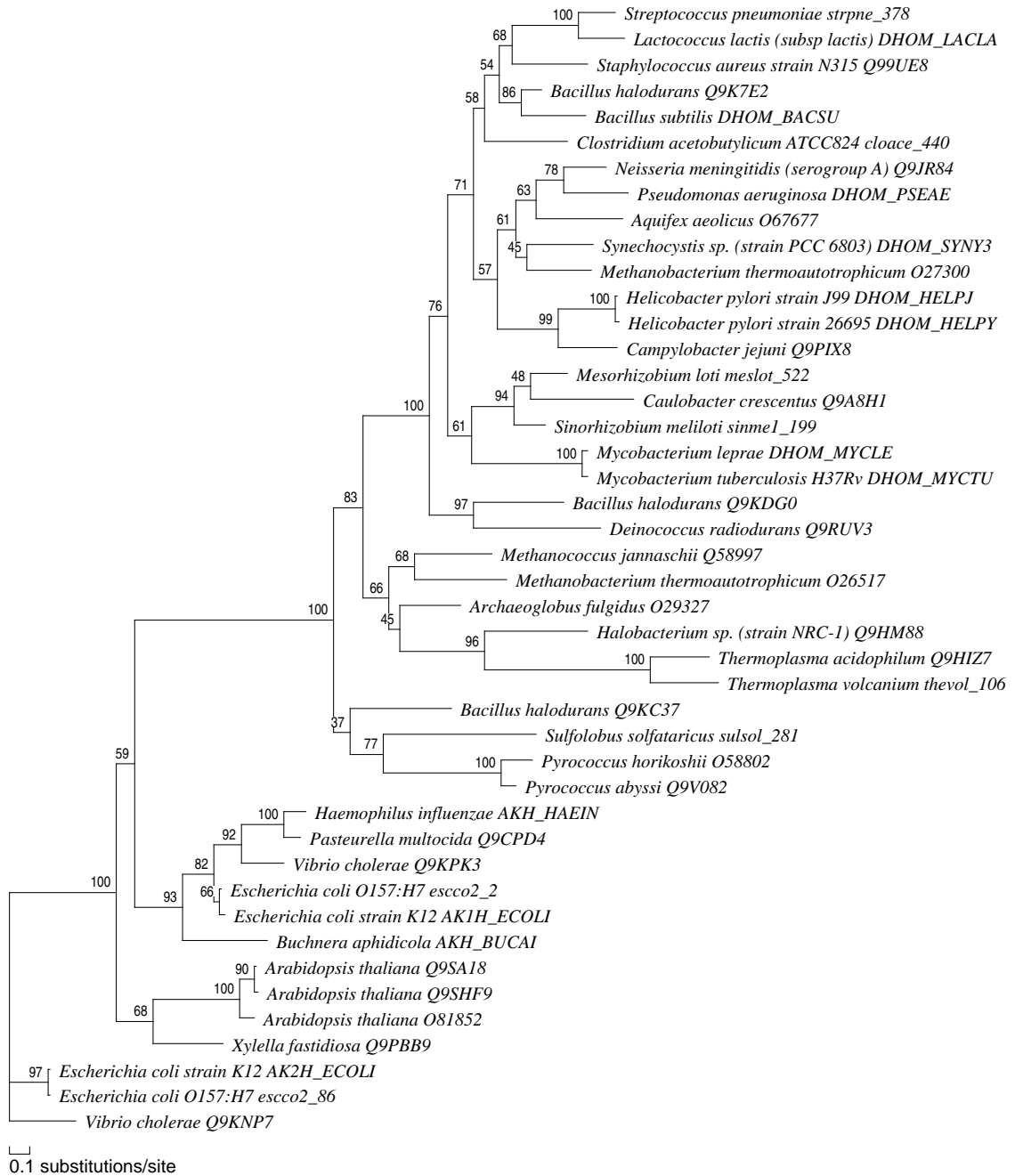


Abbildung A.32: Homoserindehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 33

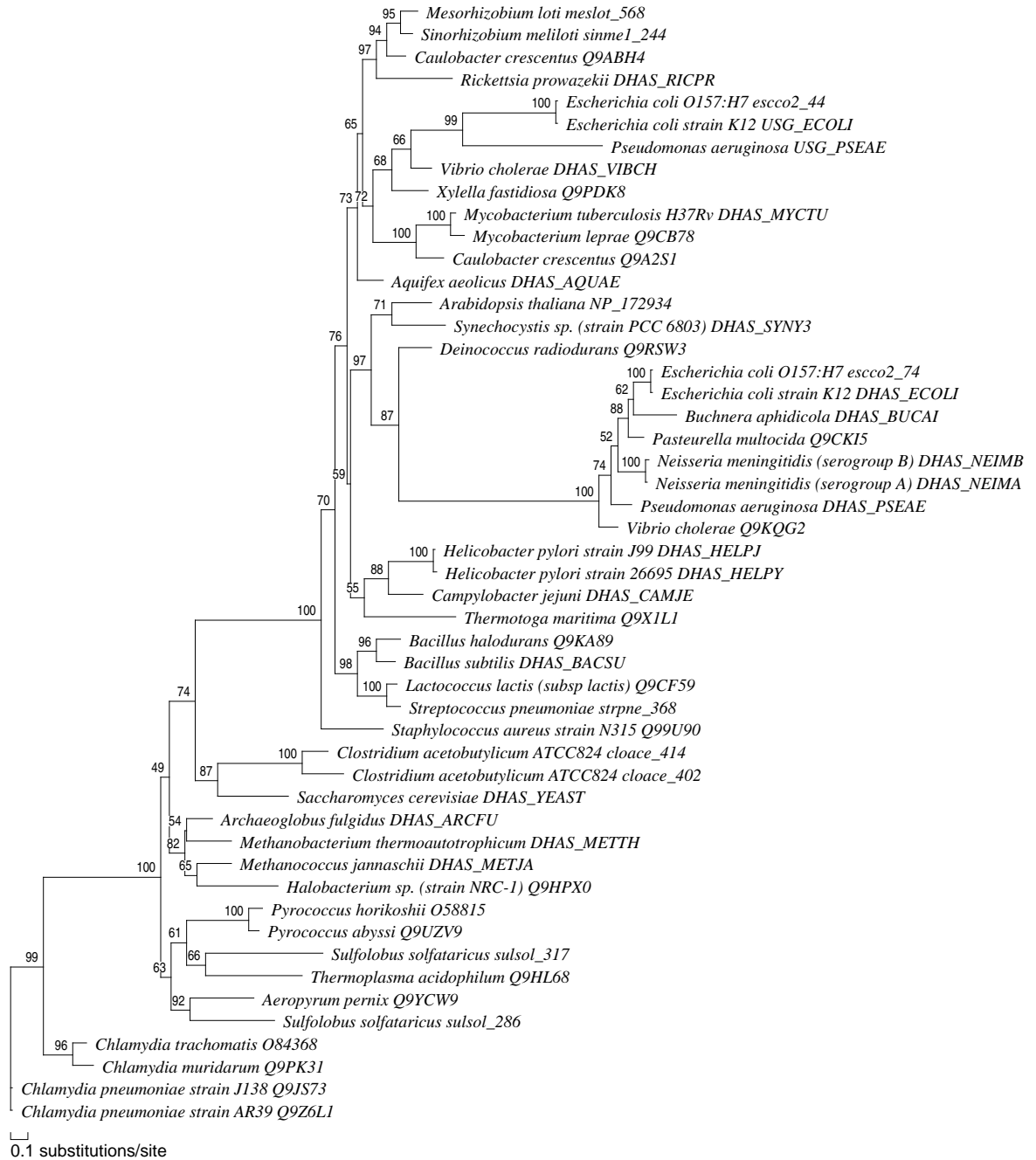


Abbildung A.33: Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 34

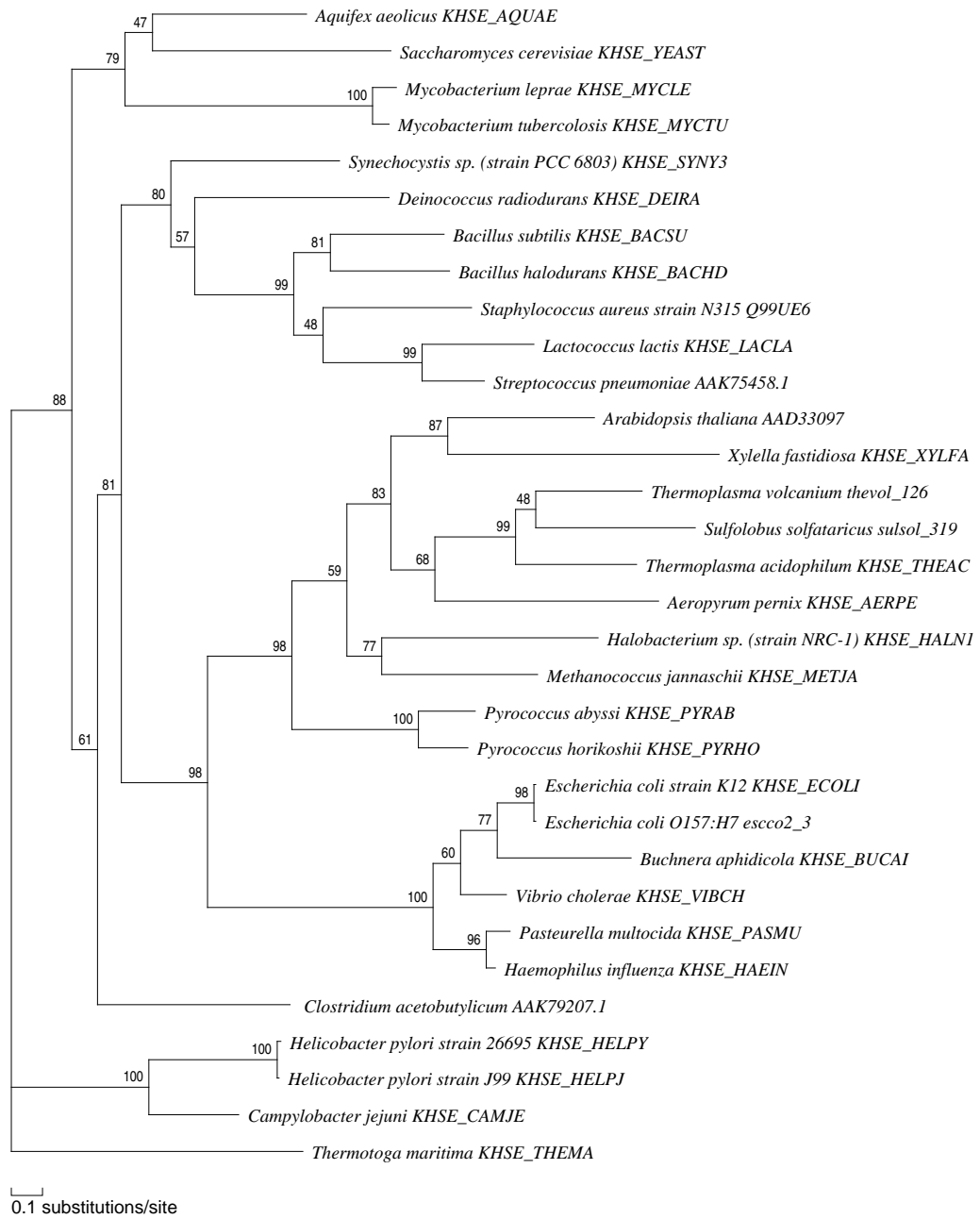


Abbildung A.34: Homoserinkinase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 35



Abbildung A.35: Threoninsynthese, siehe Tabelle 3.1 Nr. 36

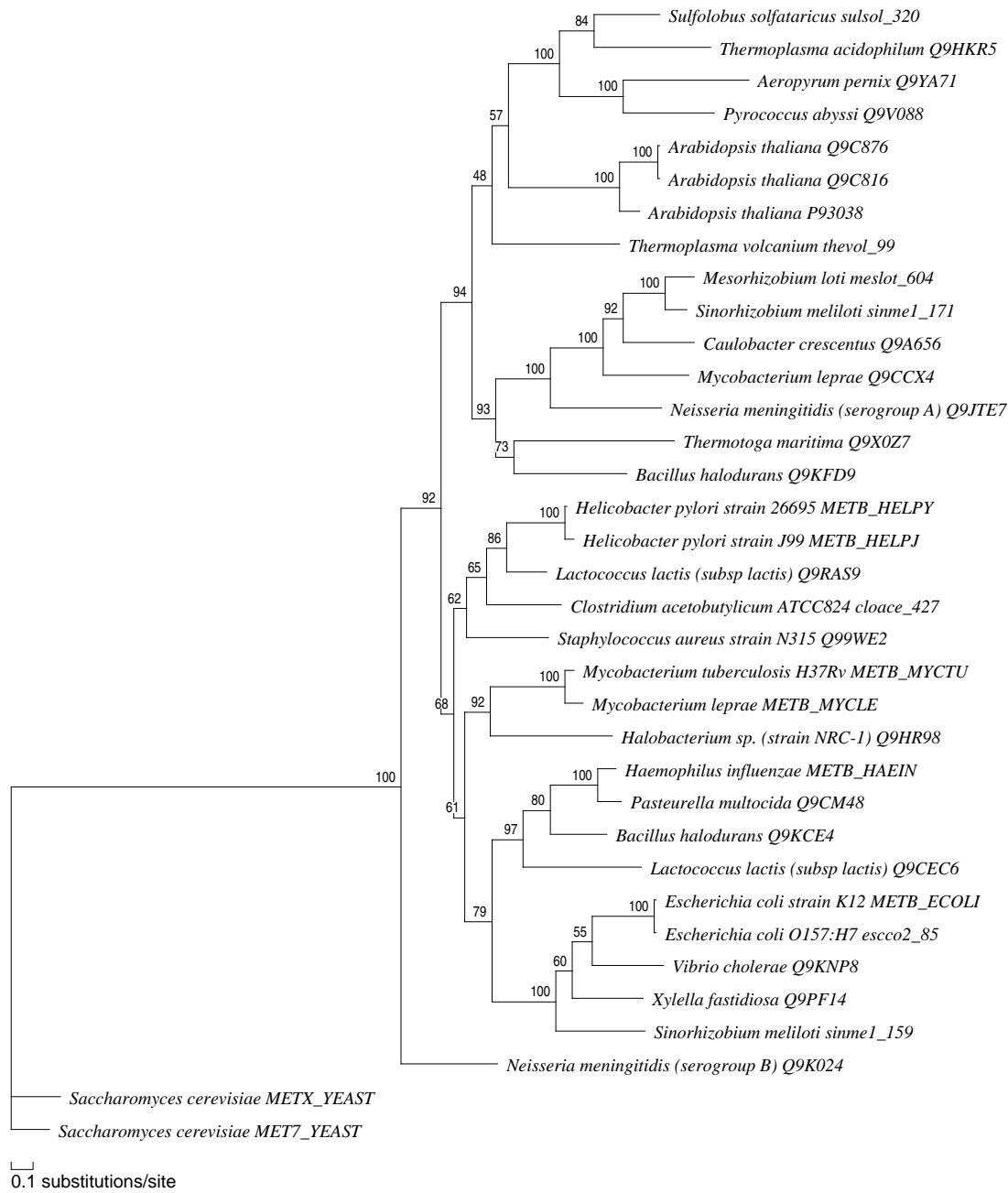
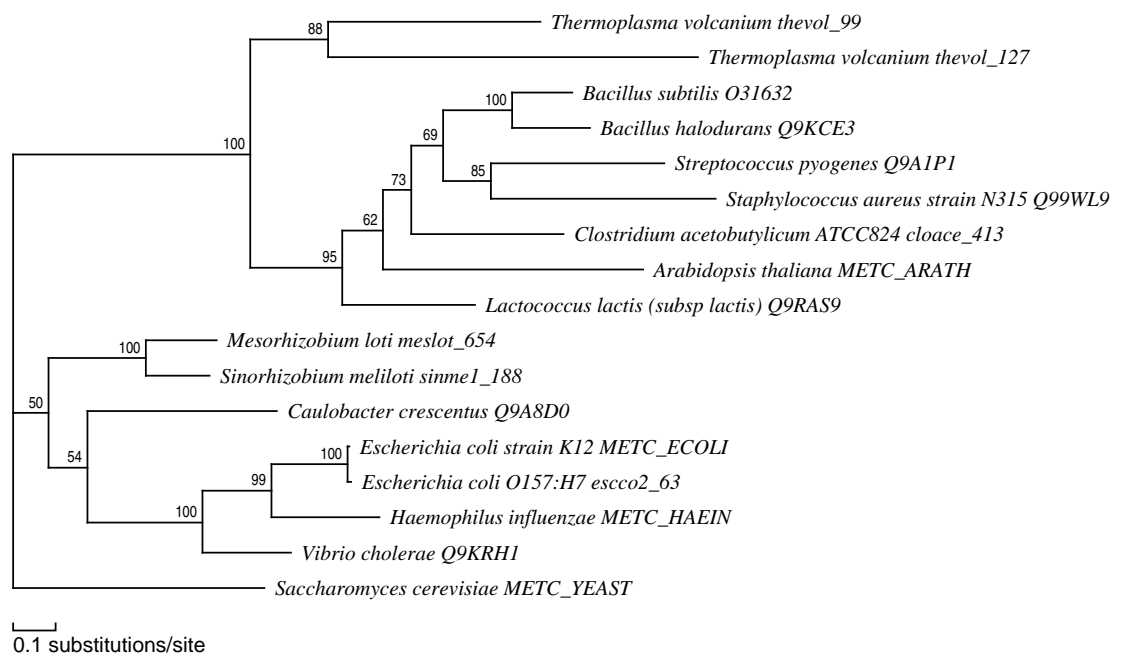


Abbildung A.36: Cystathionin-γ-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 37



Abbildung A.37: Cystathionin- $\beta$ -Lyase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 38

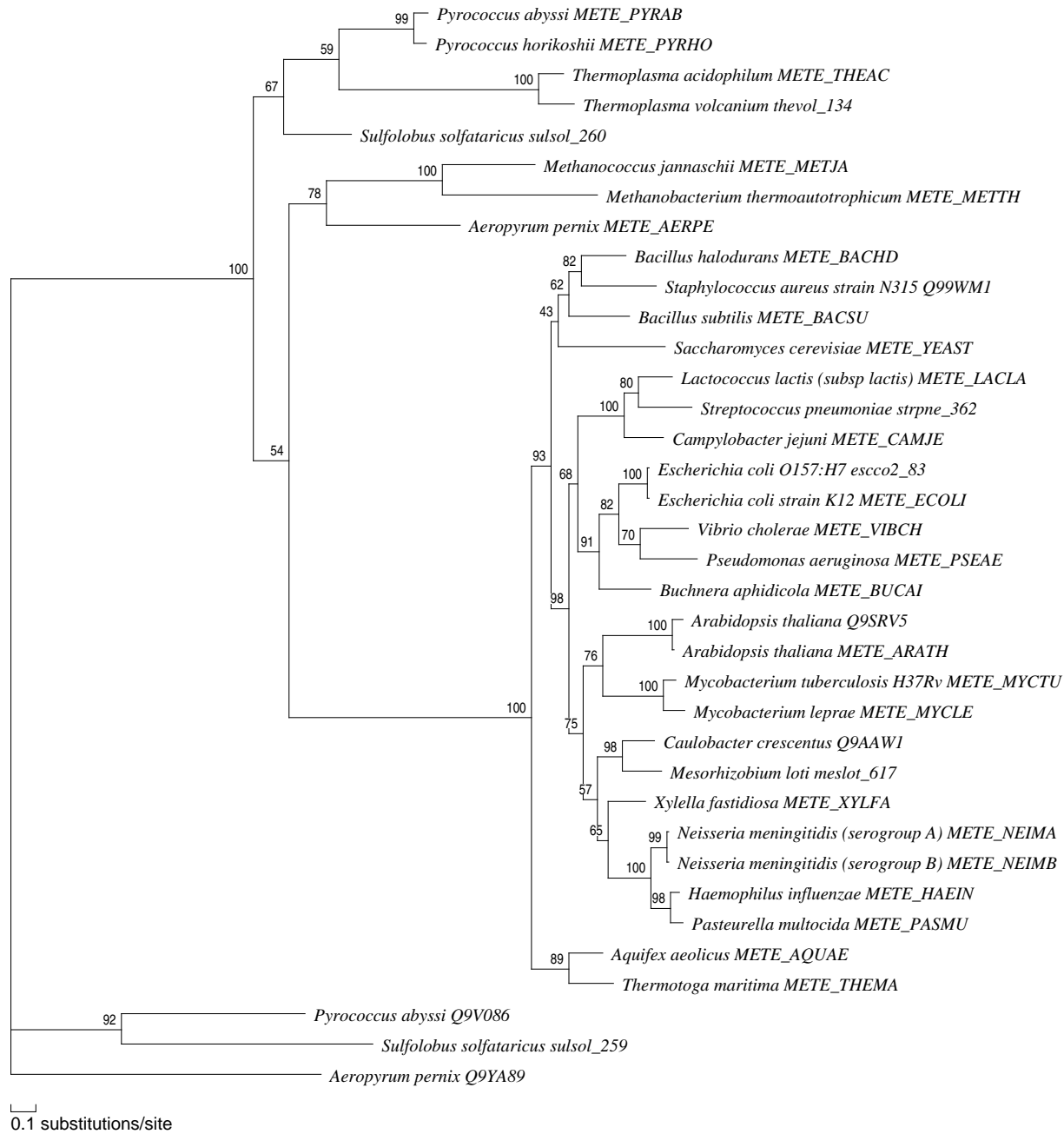


Abbildung A.38: Methioninsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 39

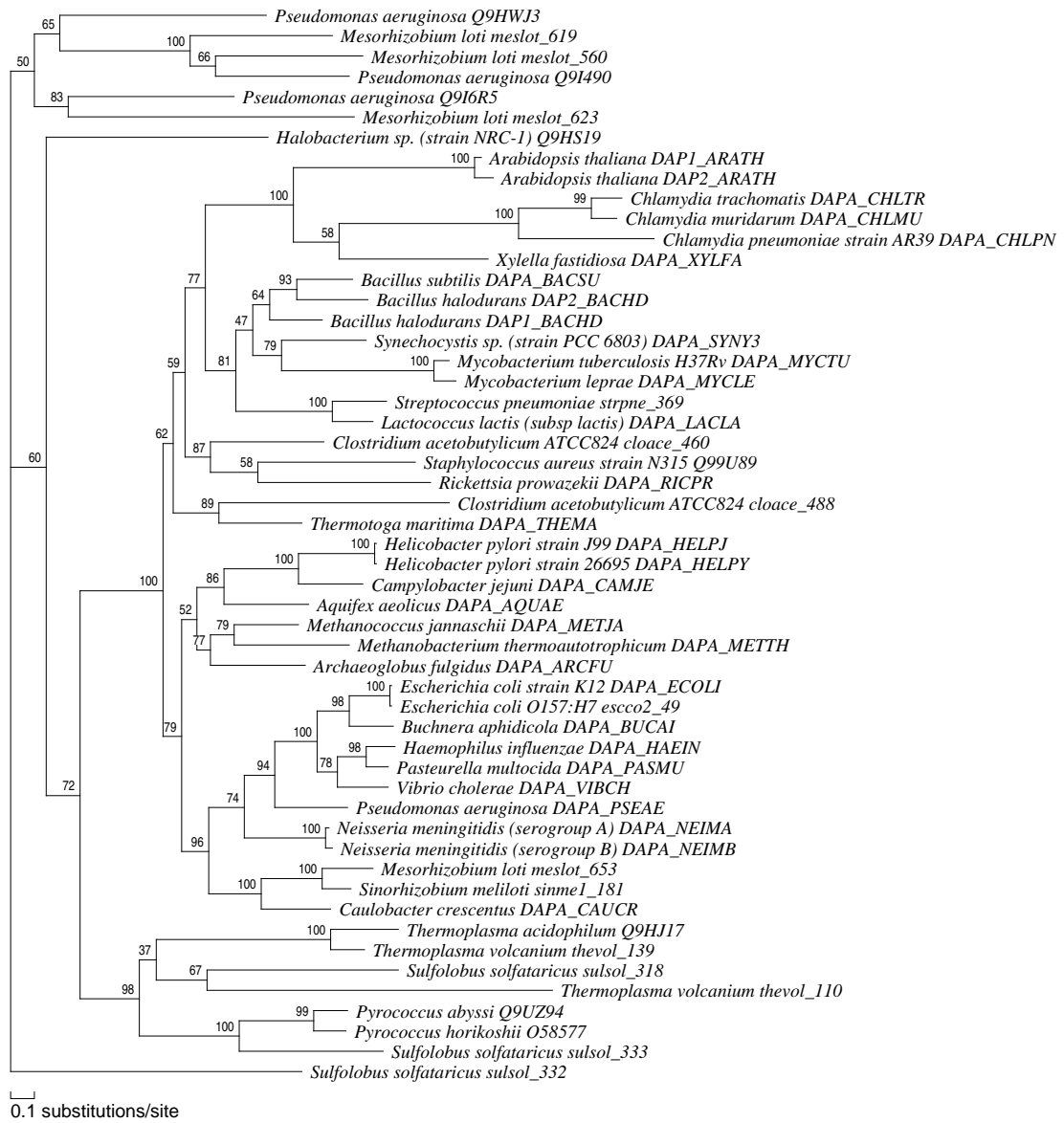


Abbildung A.39: Dihydrodipicolinat-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 40

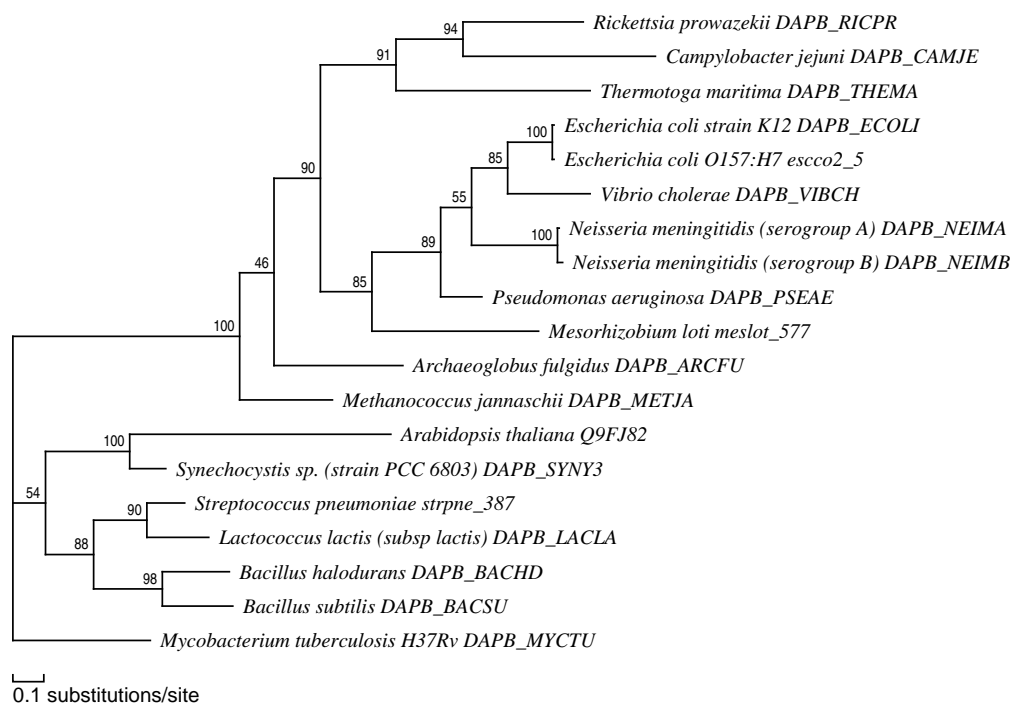


Abbildung A.40: Dihydrodipicolinatoreduktase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 41

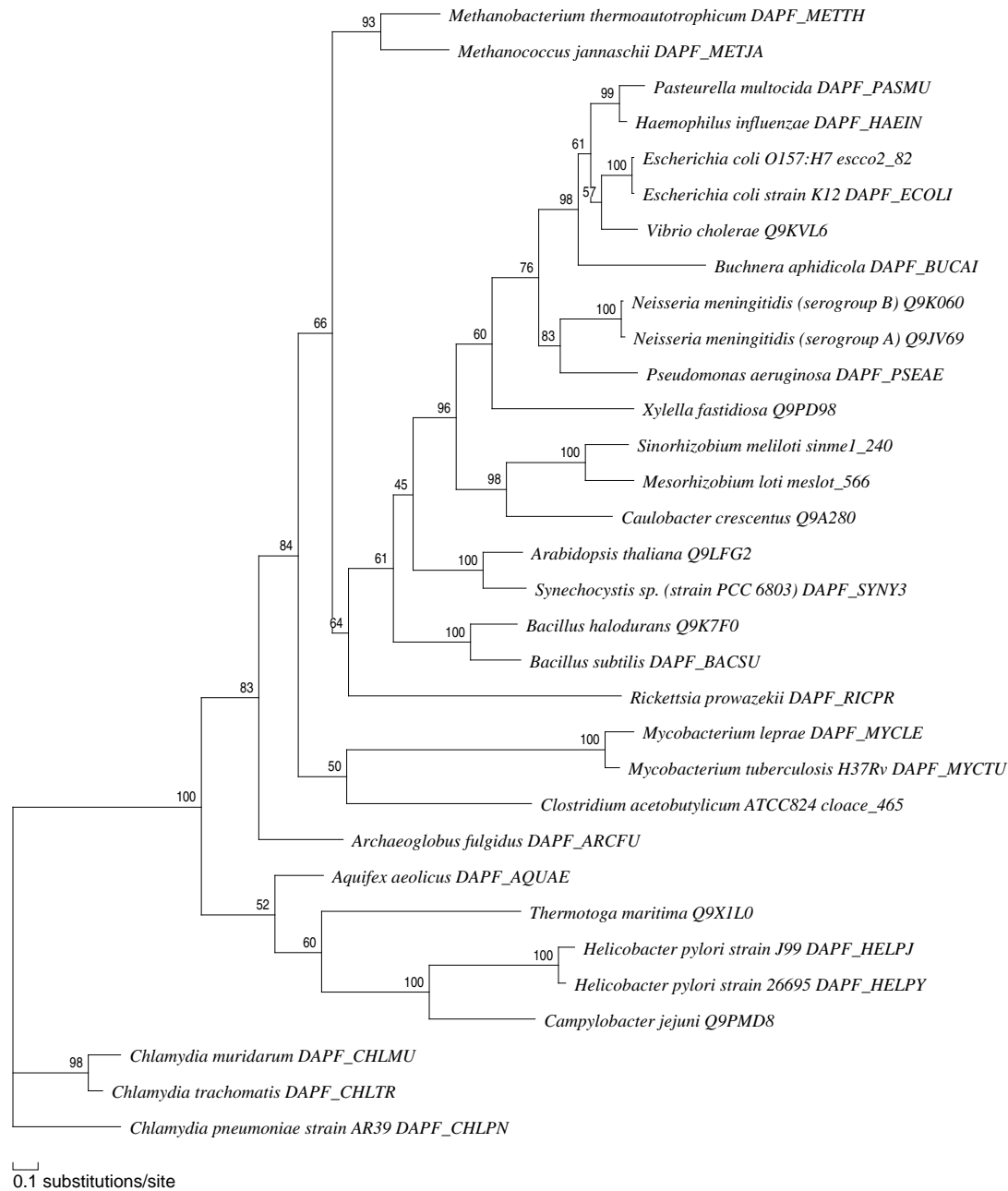


Abbildung A.41: Diaminopimelat-Epimerase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 42

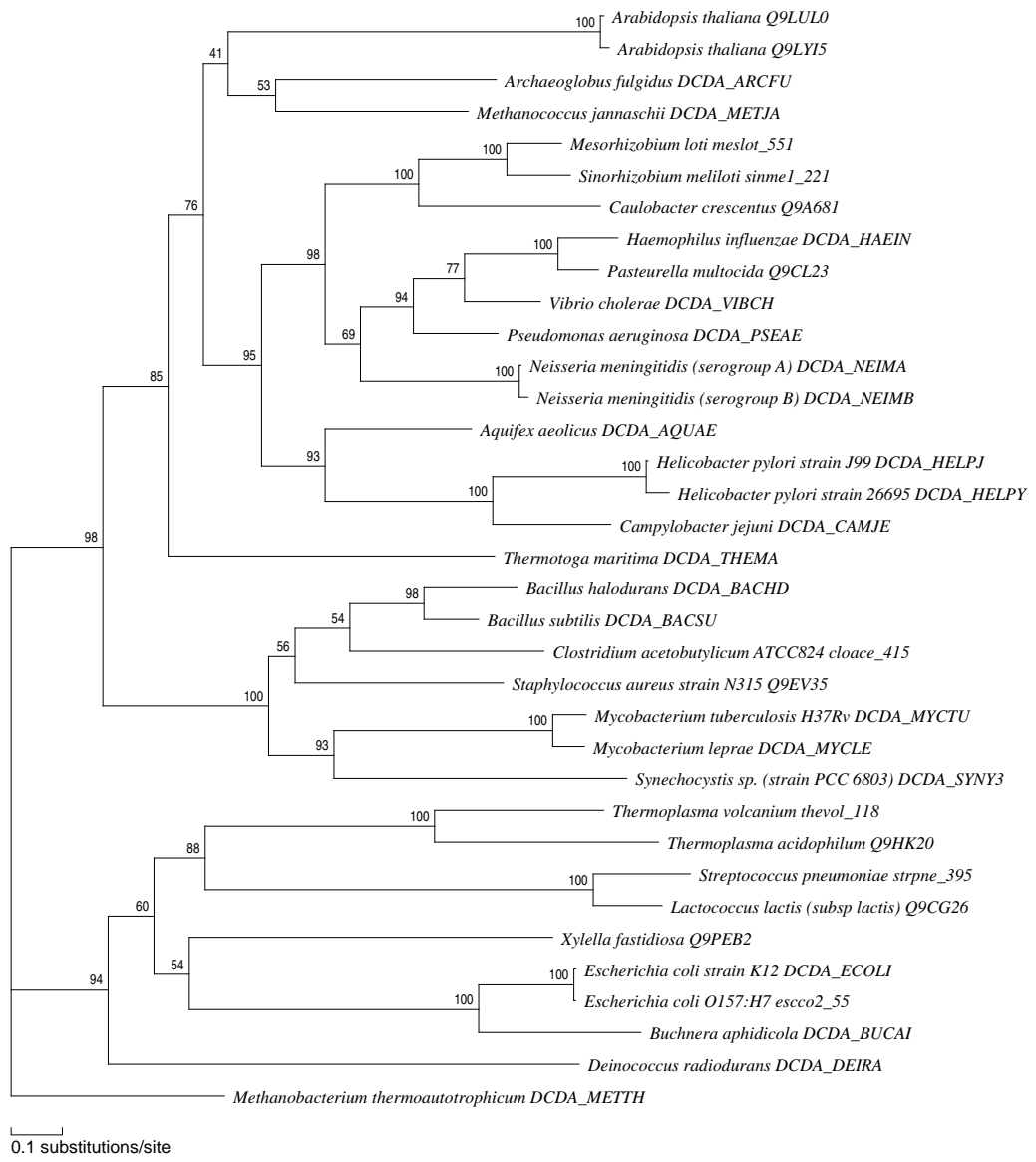


Abbildung A.42: Diaminopimelat-Decarboxylase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 43

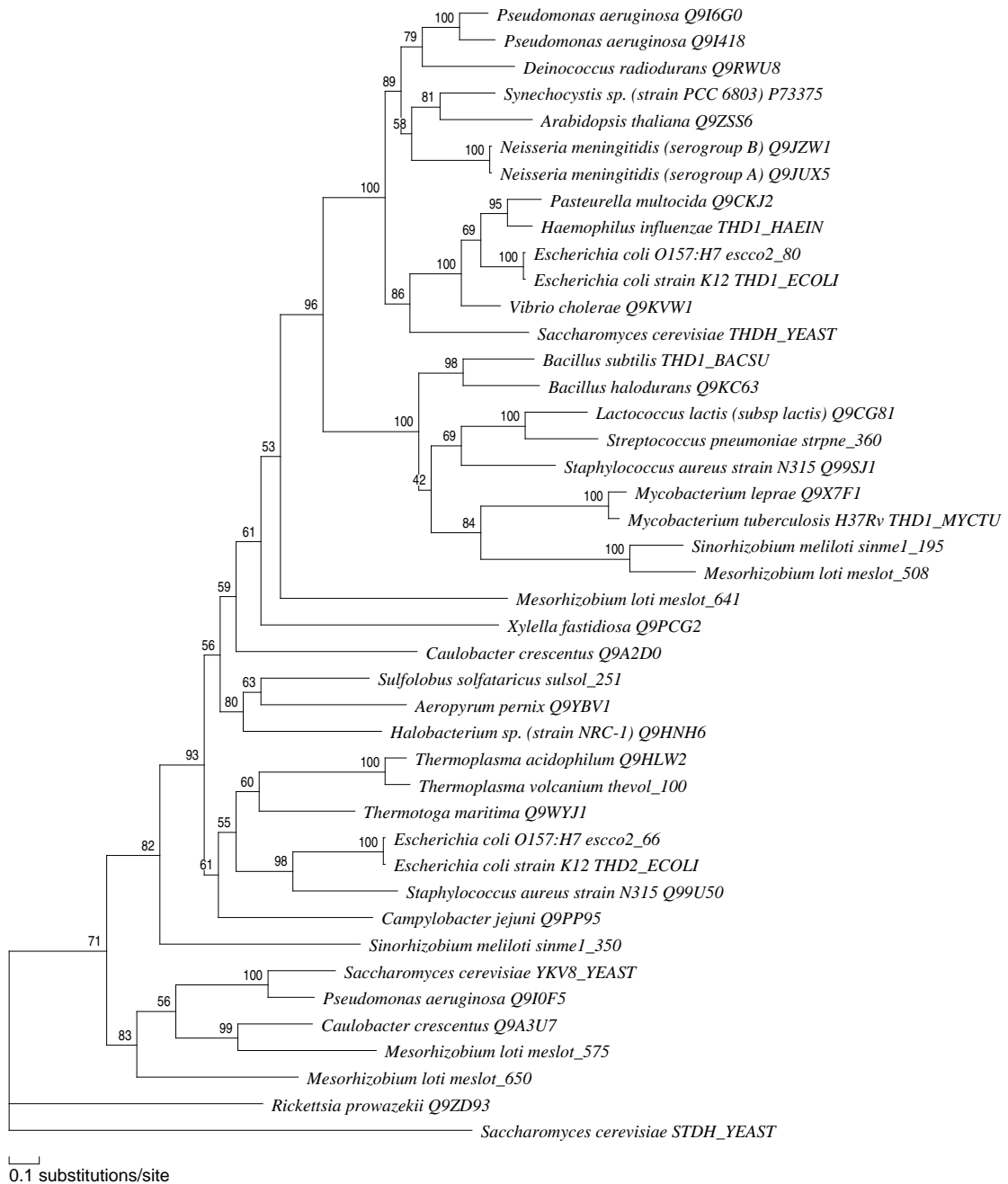


Abbildung A.43: Threonindehydratase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 44

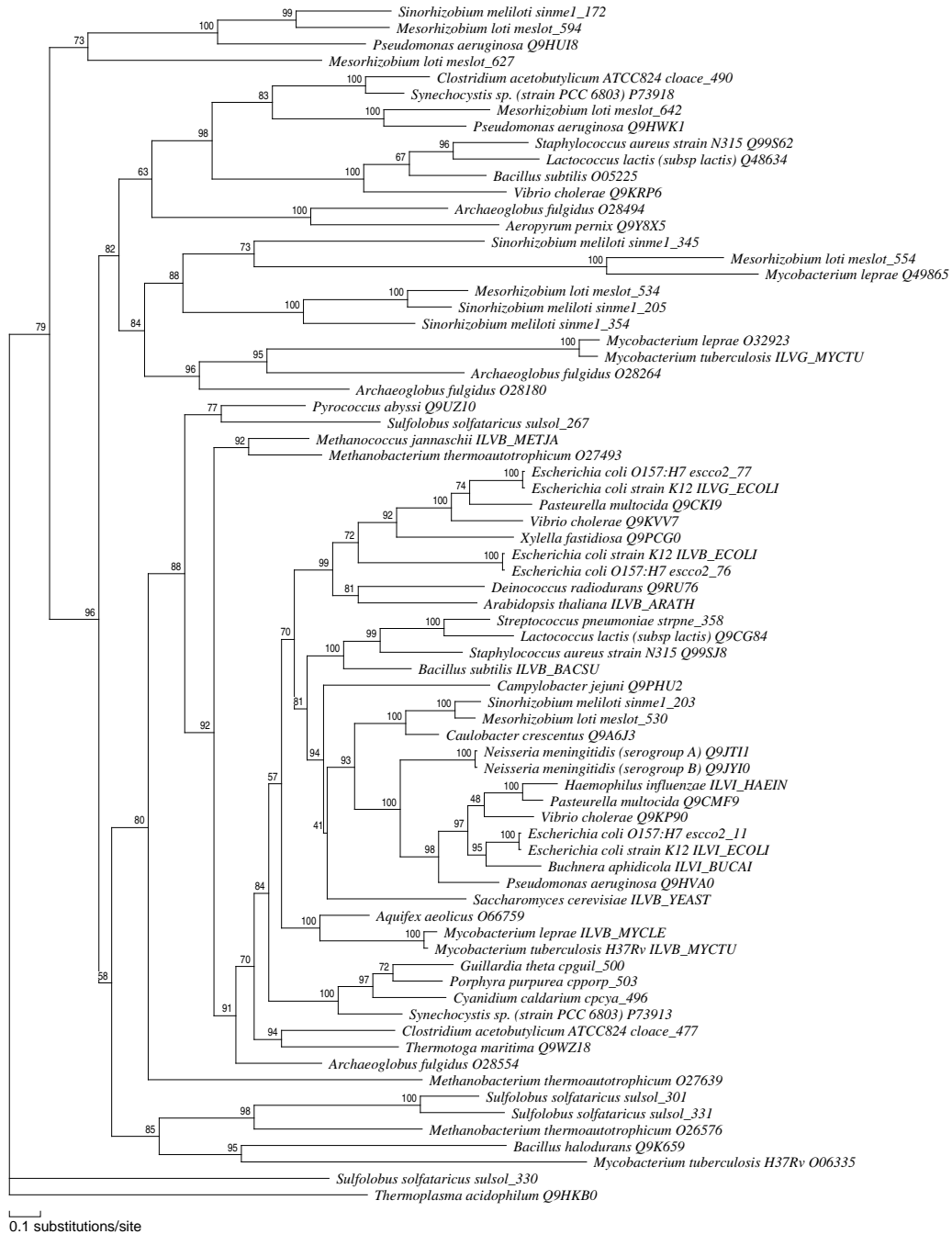


Abbildung A.44: große Untereinheit der Acetolactatsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 45



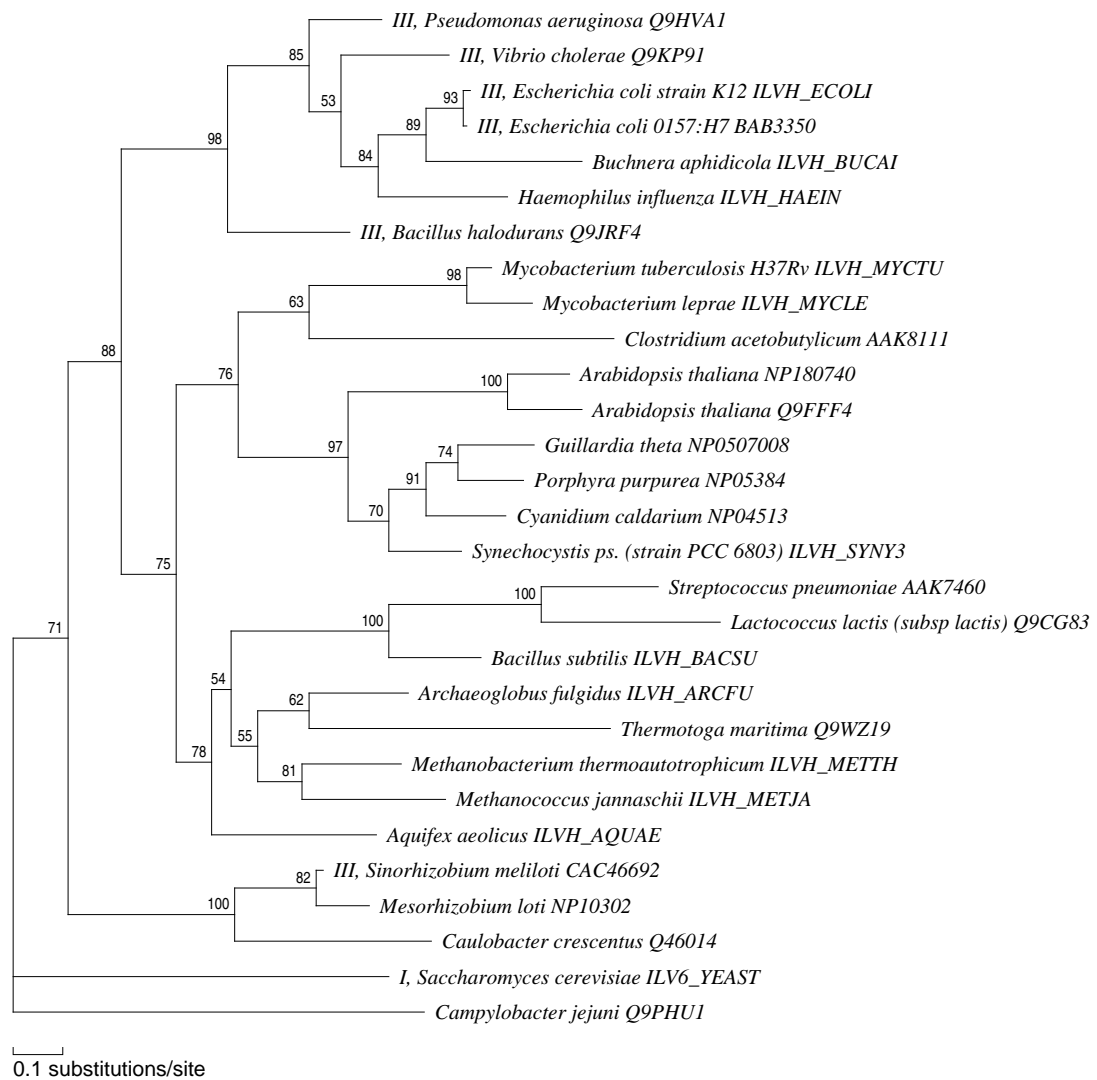


Abbildung A.45: kleine Untereinheit der Acetolactatsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 46

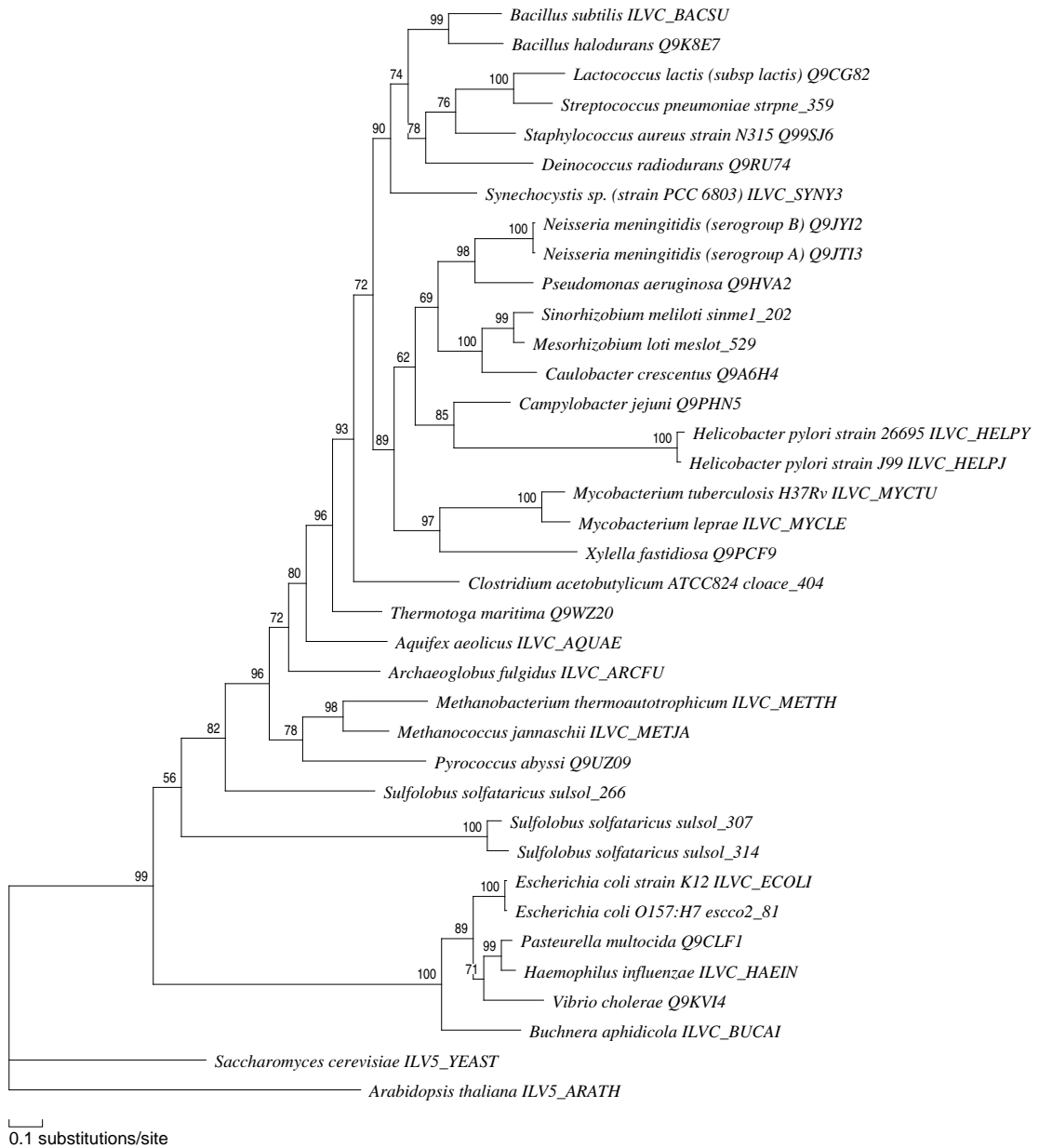


Abbildung A.46: Acetohydroxyacidisomeroreduktase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 47

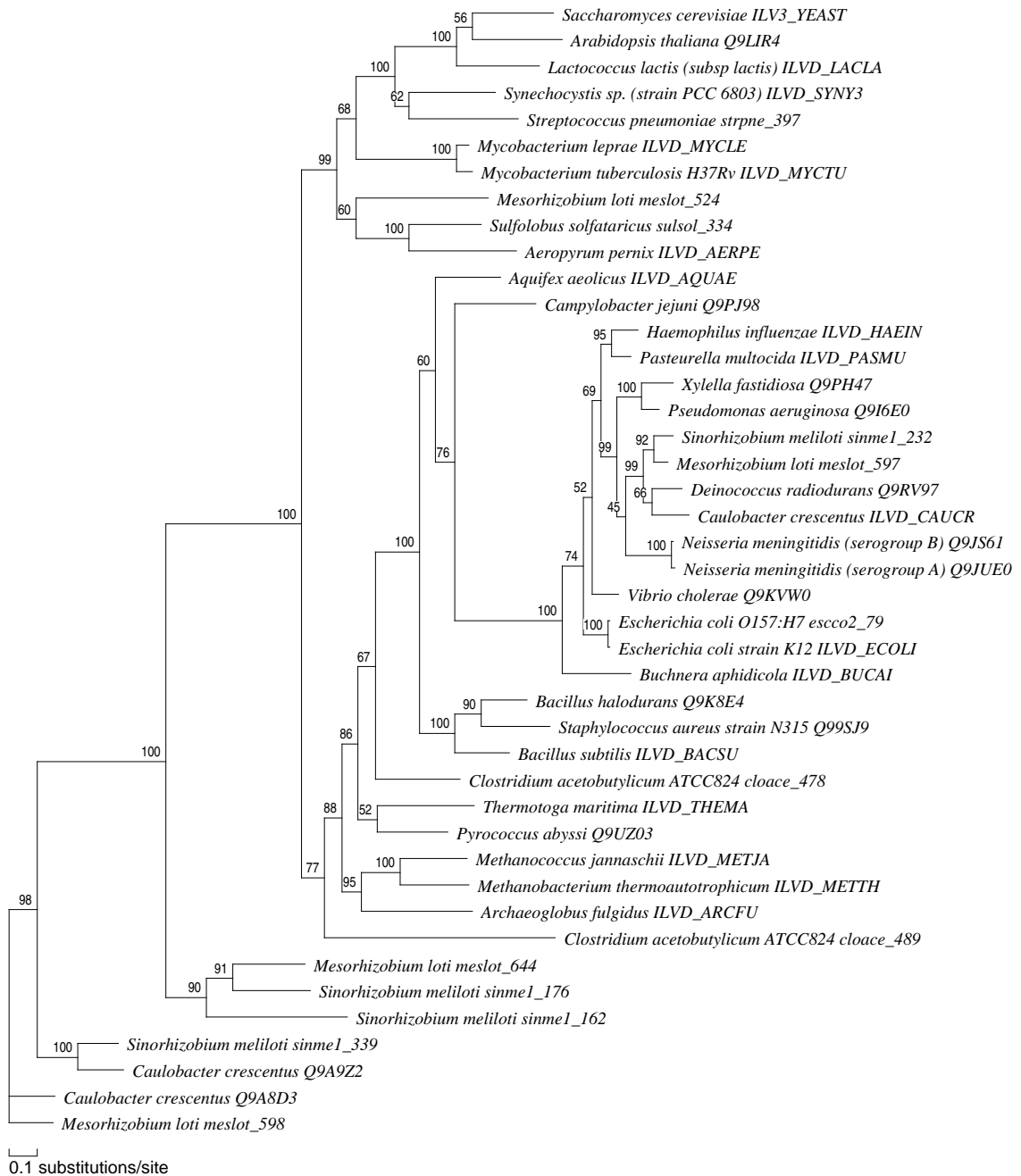


Abbildung A.47: Dihydroxyaciddehydratase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 48

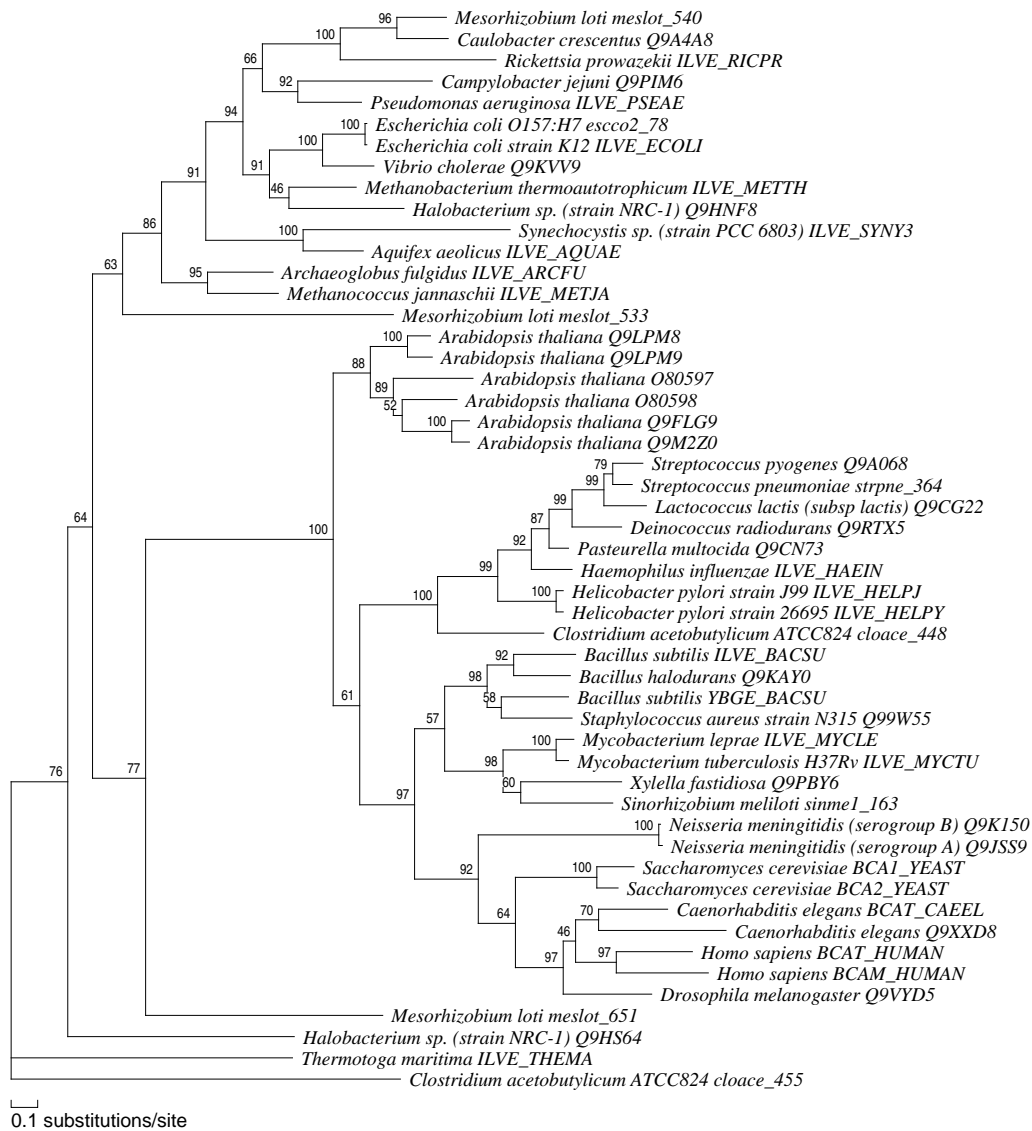


Abbildung A.48: Branched-chain Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 49

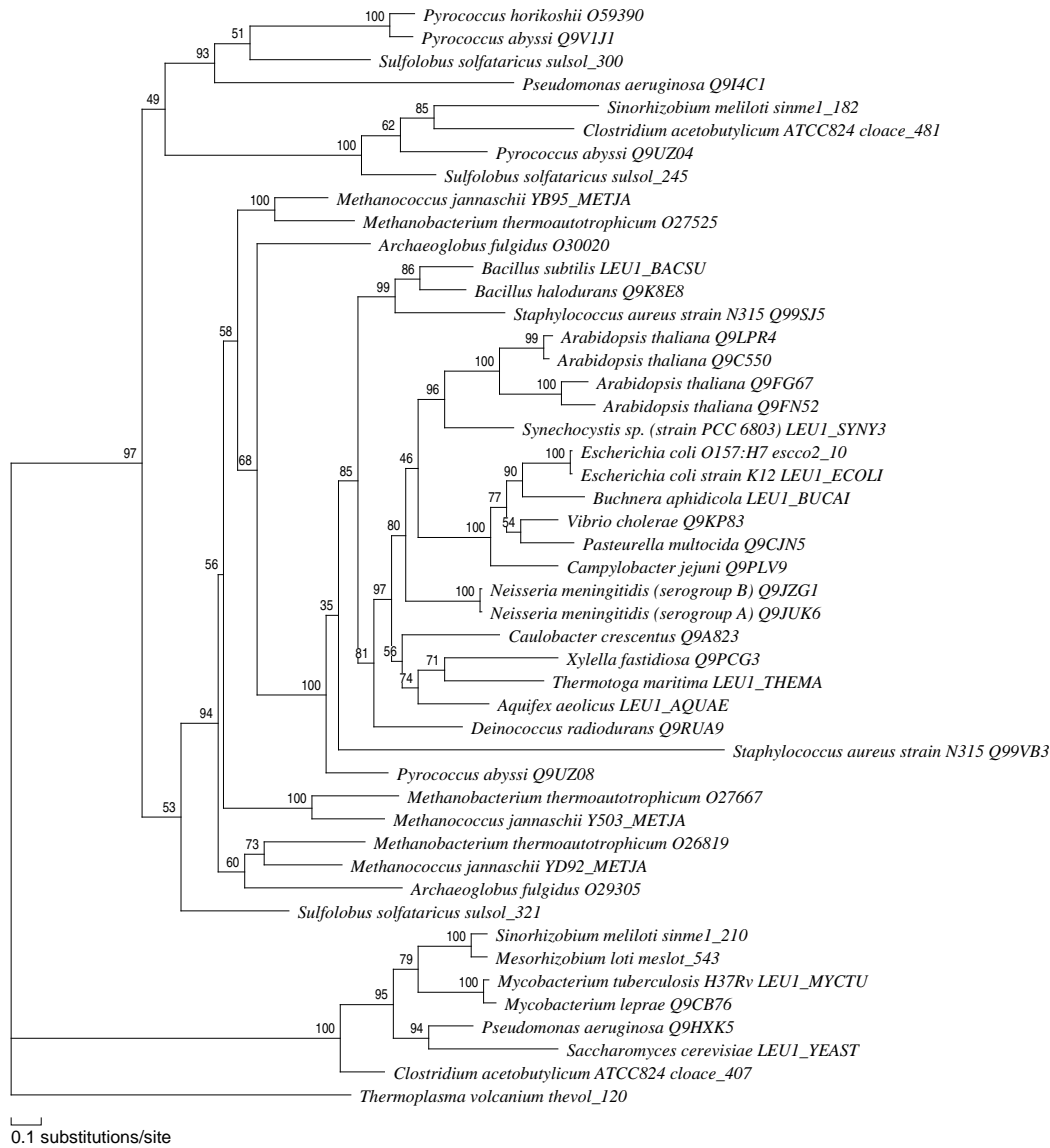


Abbildung A.49: Isopropylmalat-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 50

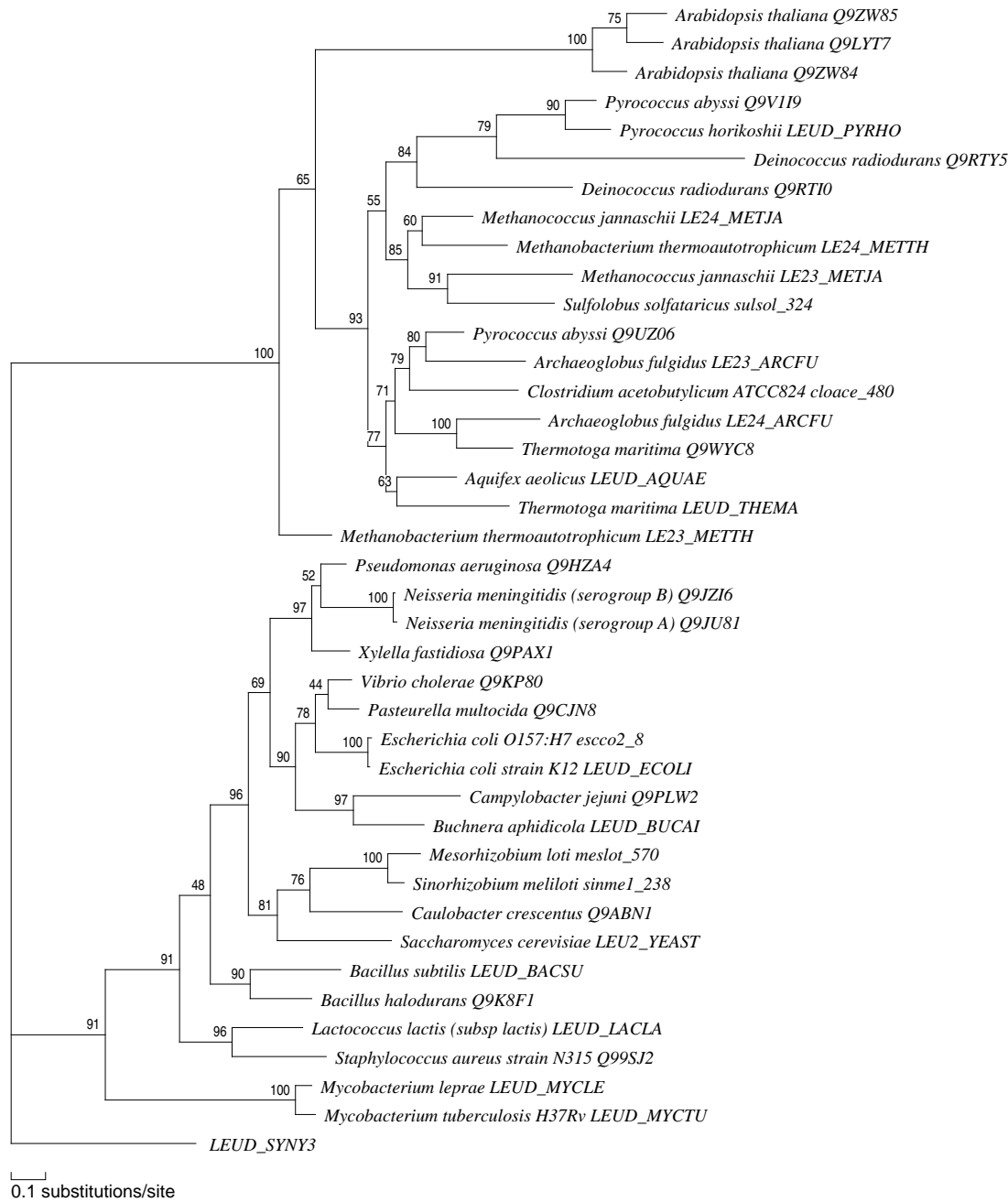


Abbildung A.50: kleine Untereinheit der Isopropylmalatisomerase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 51

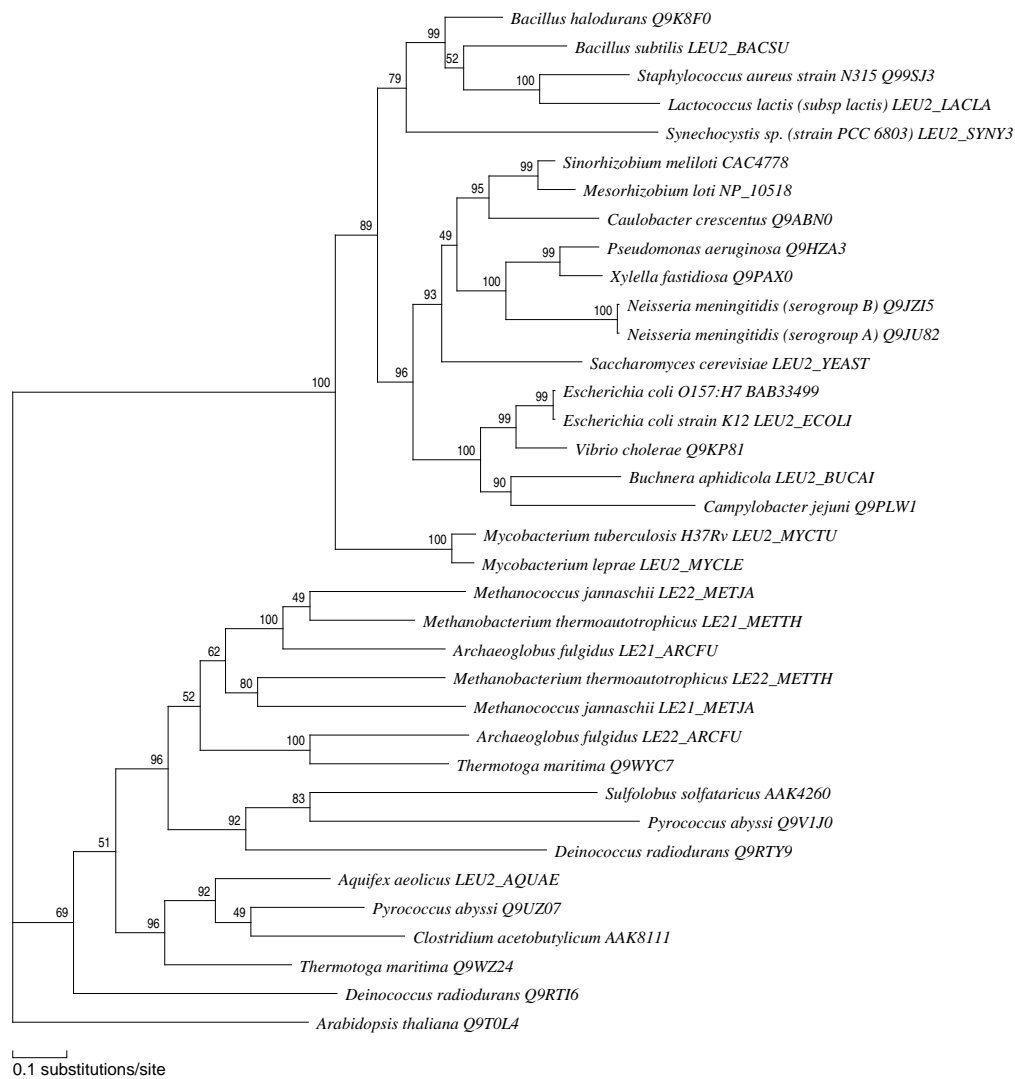


Abbildung A.51: große Untereinheit der Isopropylmalatase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 52

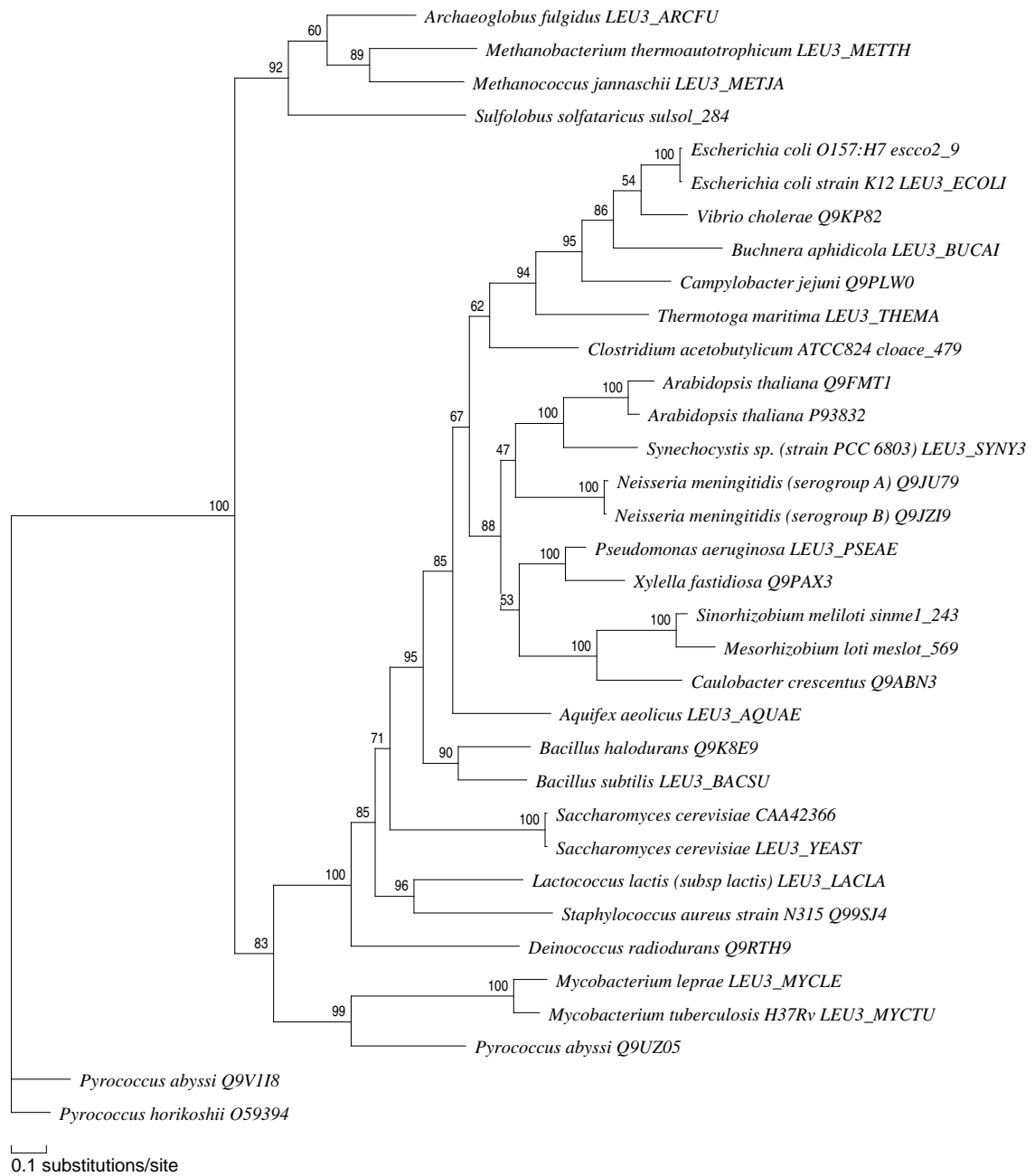


Abbildung A.52: Isopropylmalatdehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 53



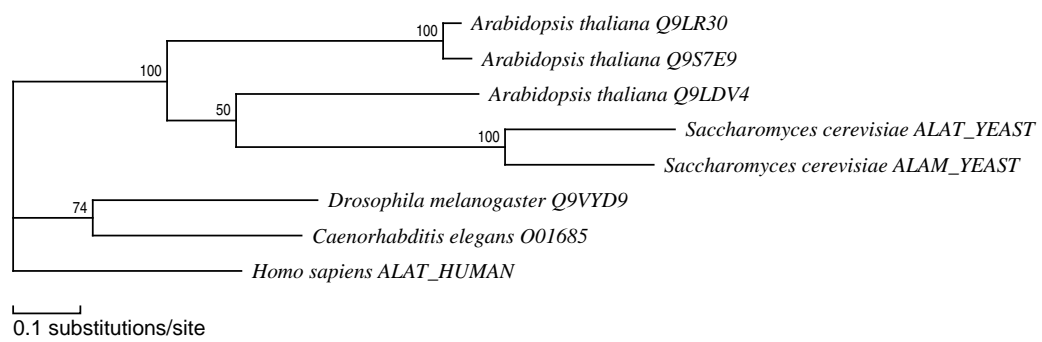


Abbildung A.53: Alanin-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 54

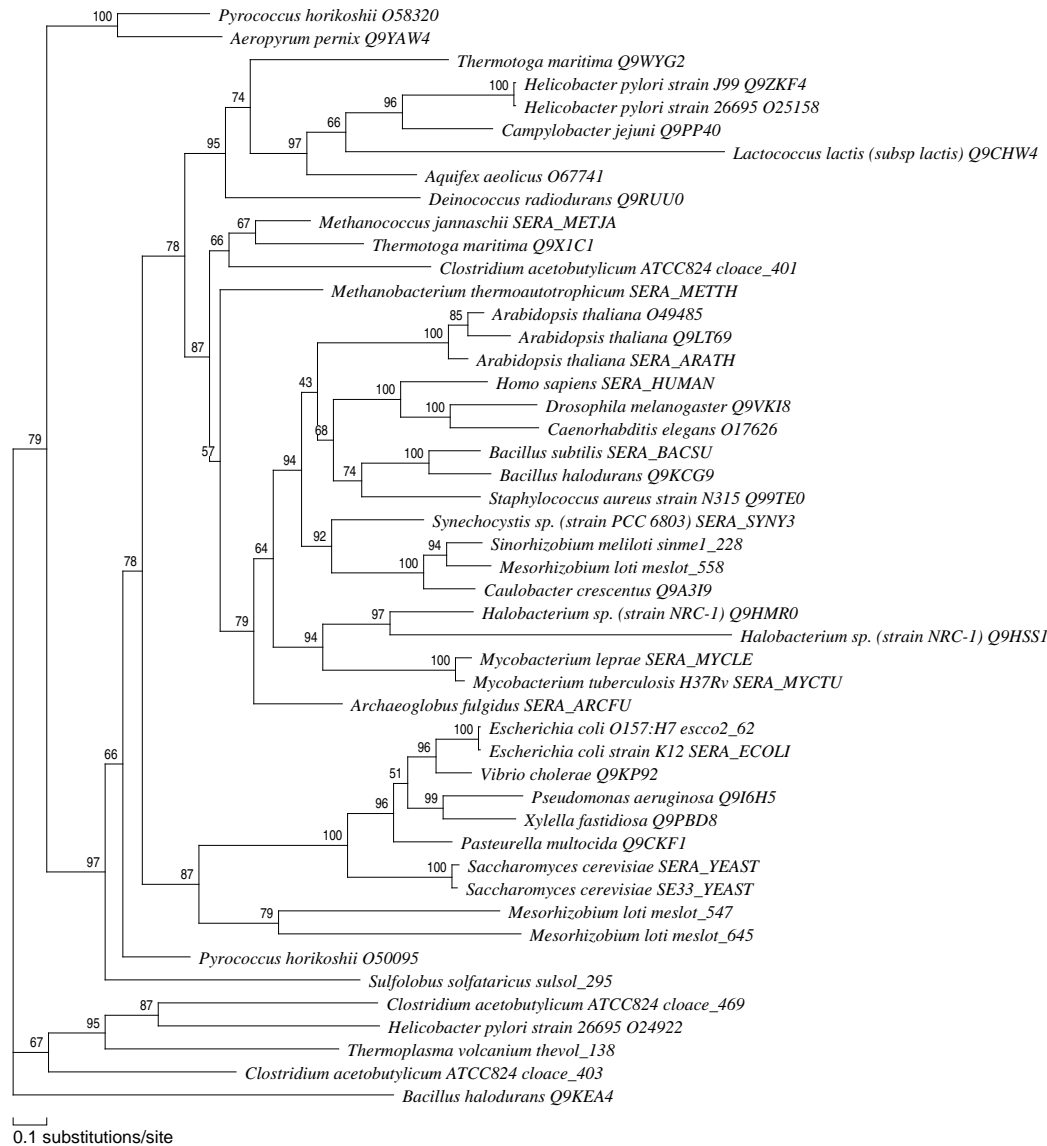


Abbildung A.54: Phosphoglycerat-Dehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 55

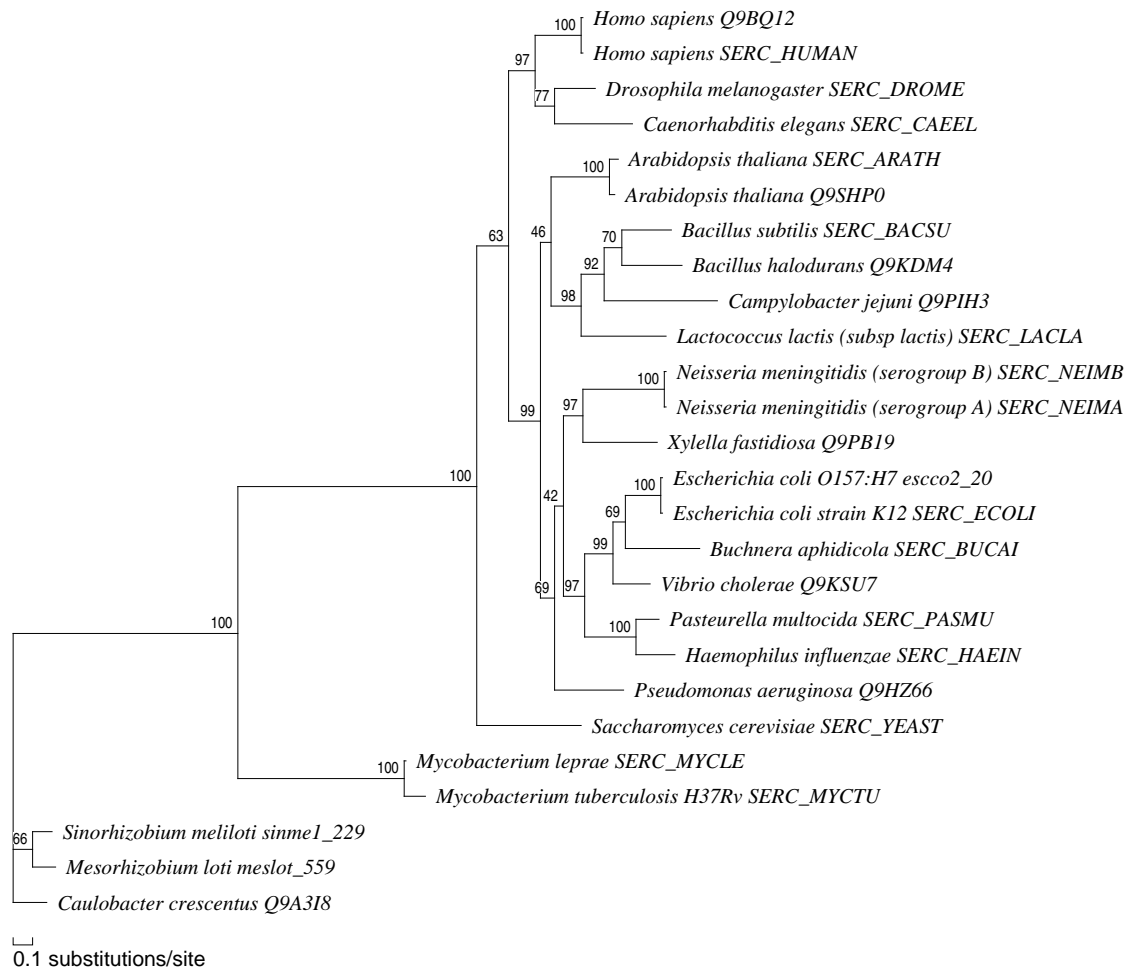


Abbildung A.55: Phosphoserin-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 56

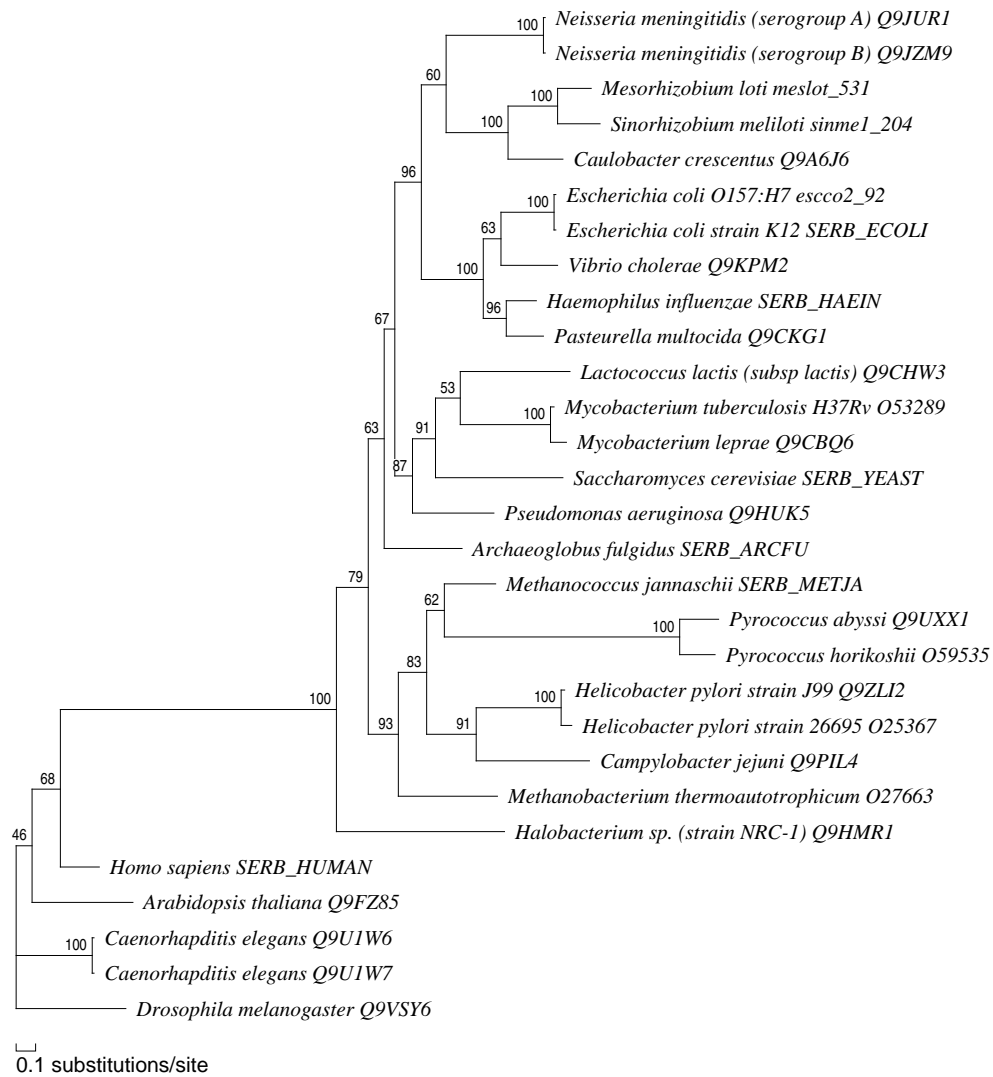


Abbildung A.56: Phosphoserinphosphatase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 57

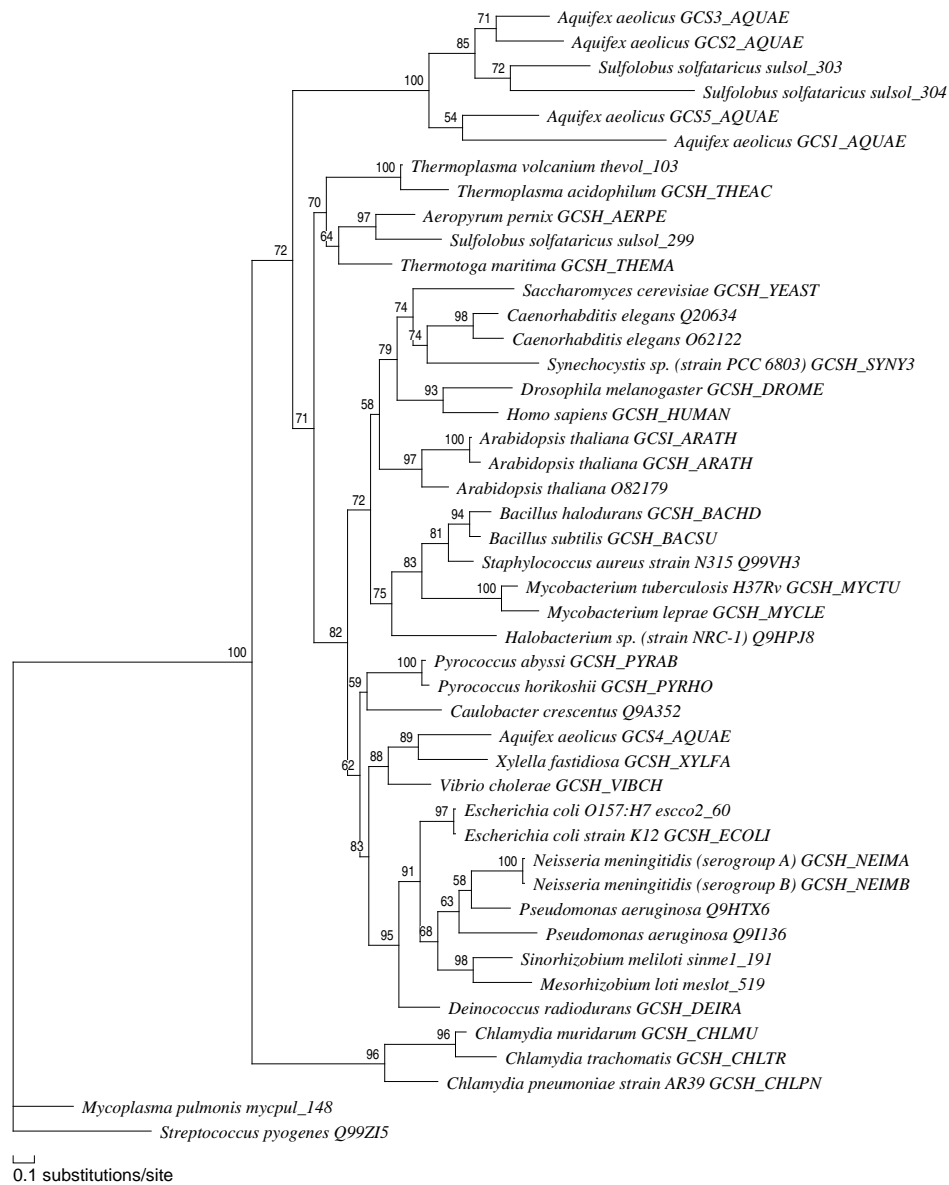


Abbildung A.57: H-Protein des Glycinderboxylase-Komplexes, siehe Tabelle 3.1 Nr. 58

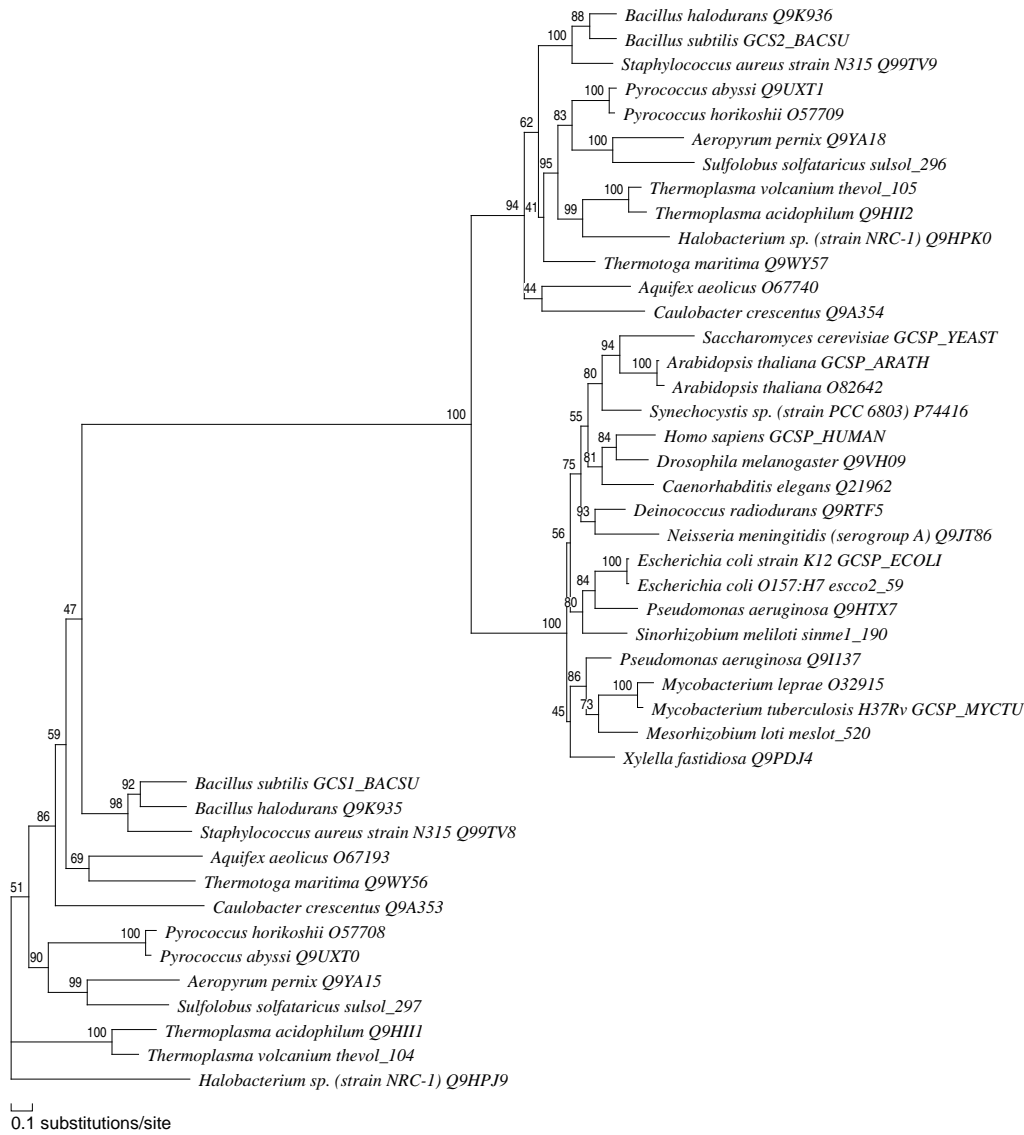


Abbildung A.58: P-Protein des Glycinecarboxylase-Komplexes, siehe Tabelle 3.1 Nr. 59

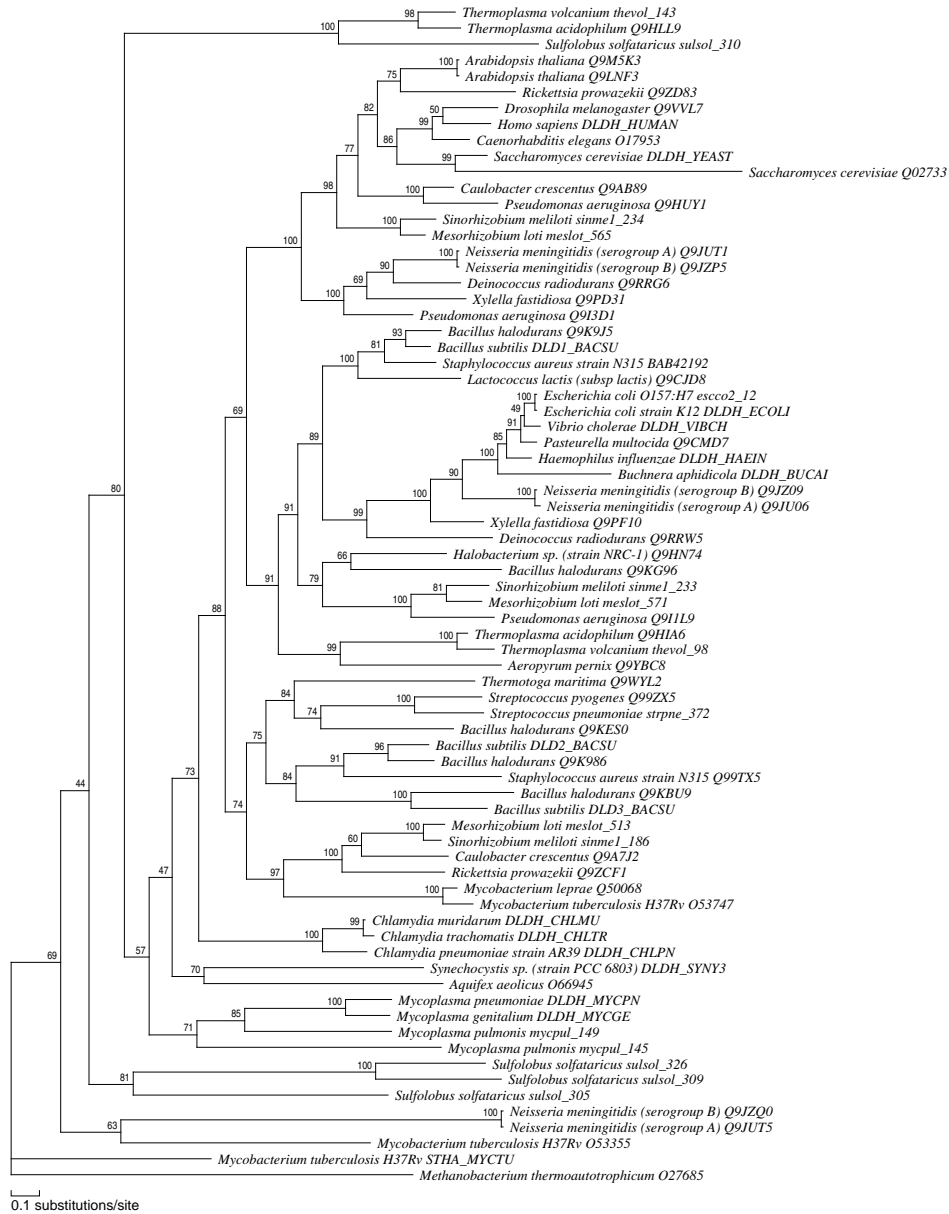


Abbildung A.59: L-Protein des Glycinecarboxylase-Komplexes, siehe Tabelle 3.1 Nr. 60

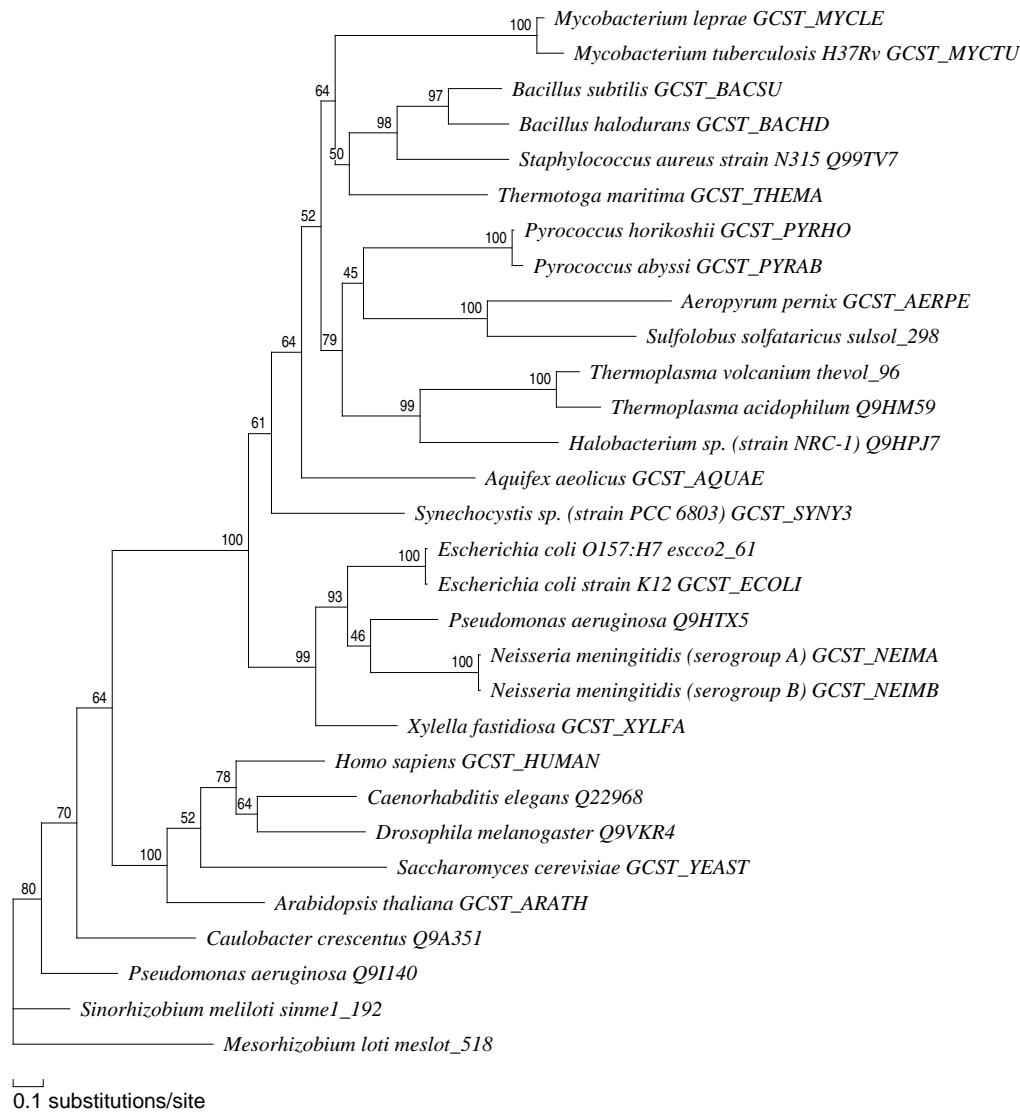


Abbildung A.60: T-Protein des Glycinecarboxylase-Komplexes, siehe Tabelle 3.1 Nr. 61





Abbildung A.61: Serinhydroxymethyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 62

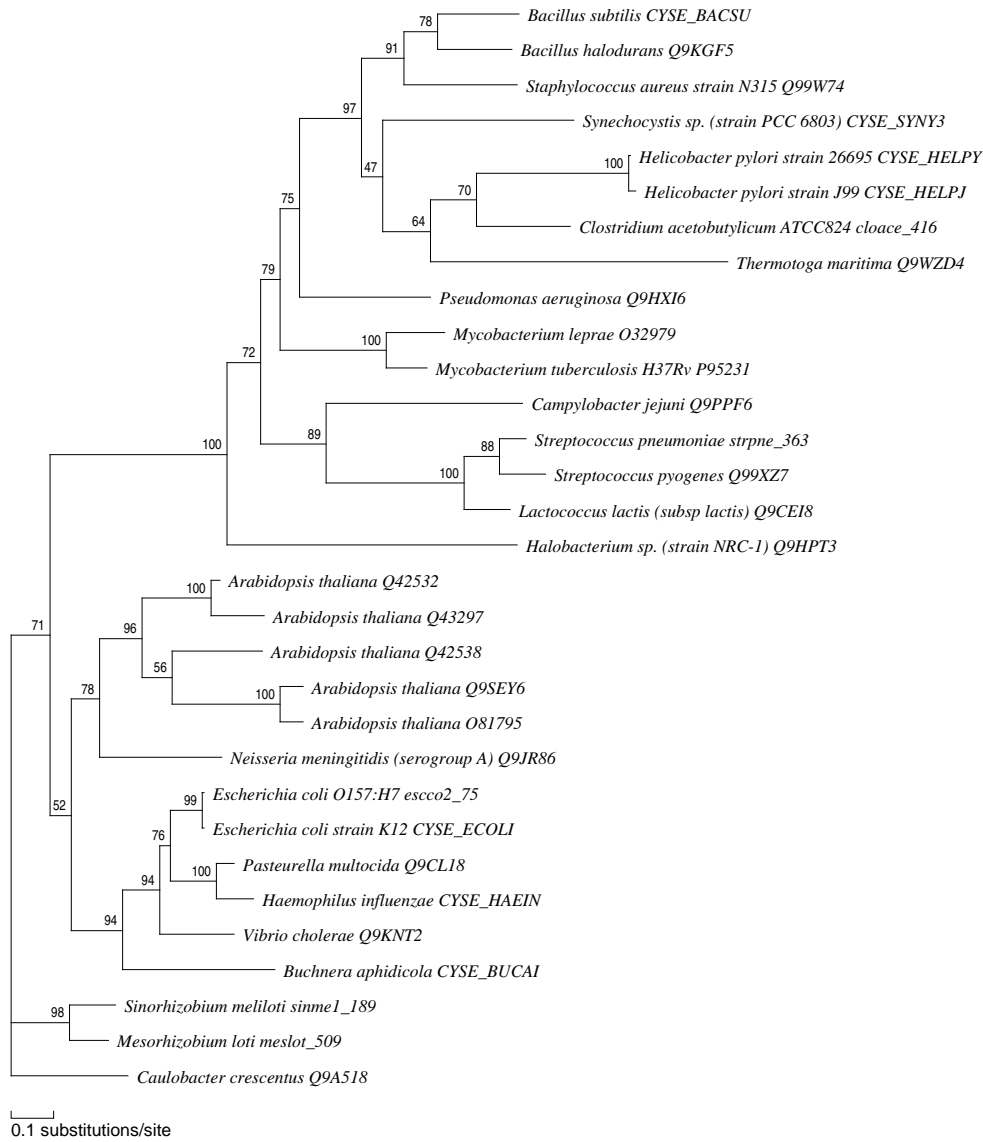


Abbildung A.62: Serinacetyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 63

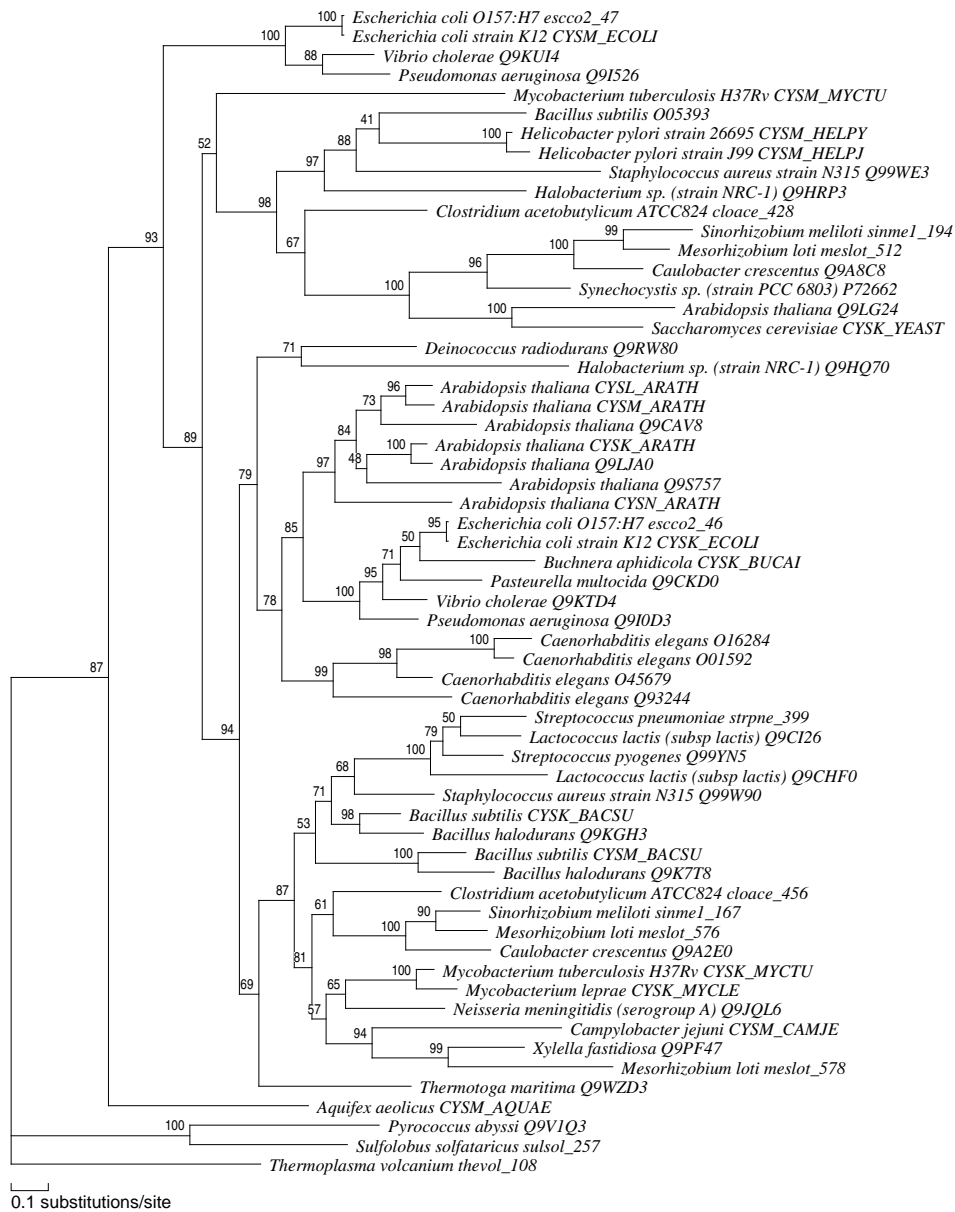


Abbildung A.63: Acetylserin-(thiol)-lyase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 64

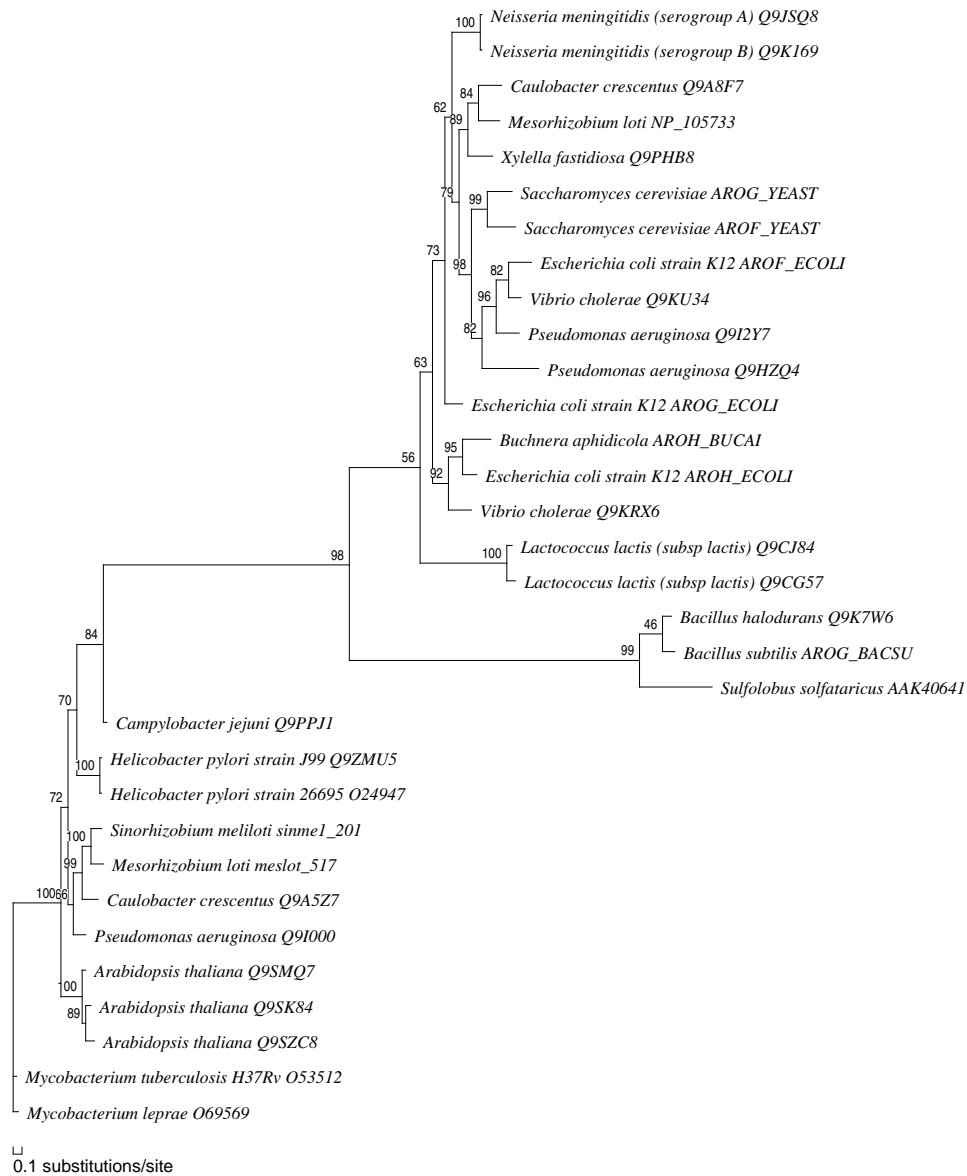


Abbildung A.64: , DHAP-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 65

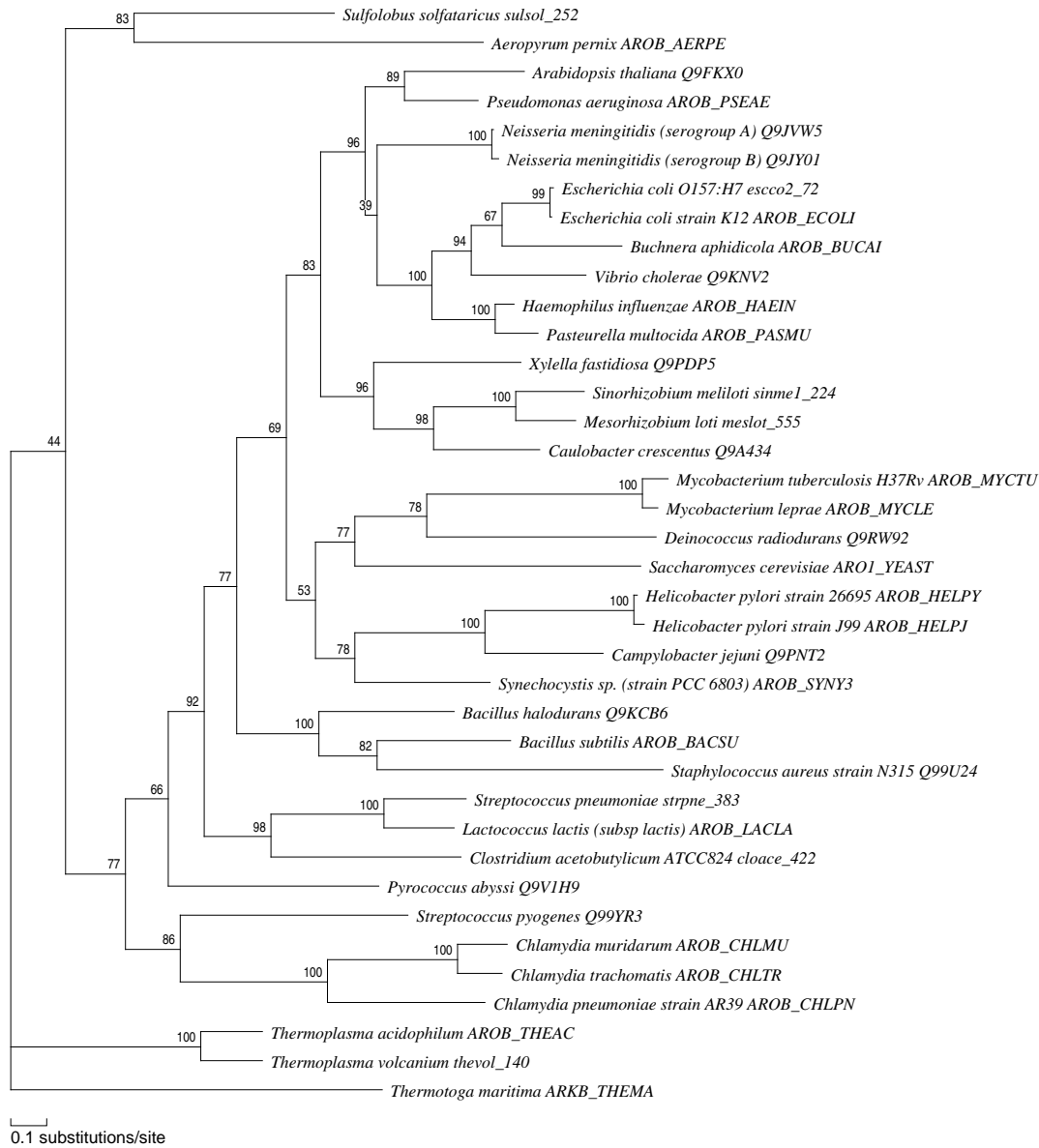


Abbildung A.65: , Dehydroquinarsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 66

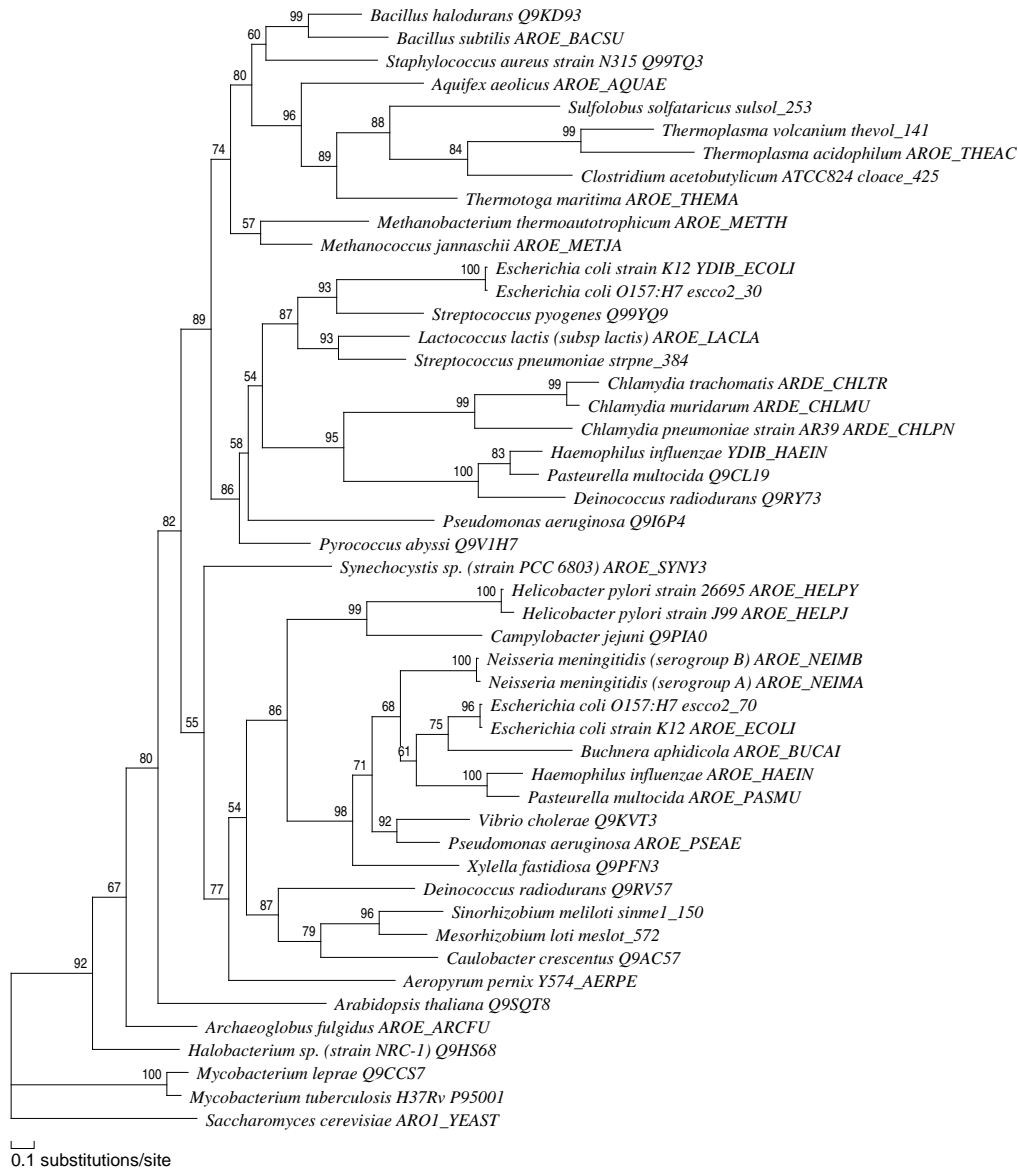


Abbildung A.66: , Skikimatdehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 67

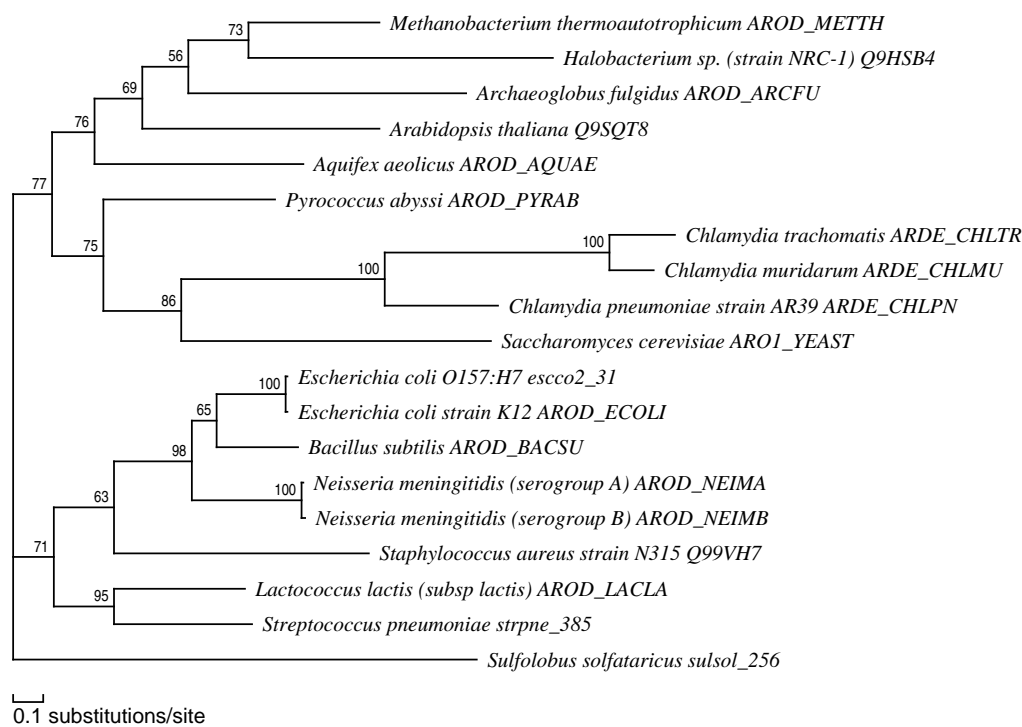


Abbildung A.67: , Dehydroquinatedehydratase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 68

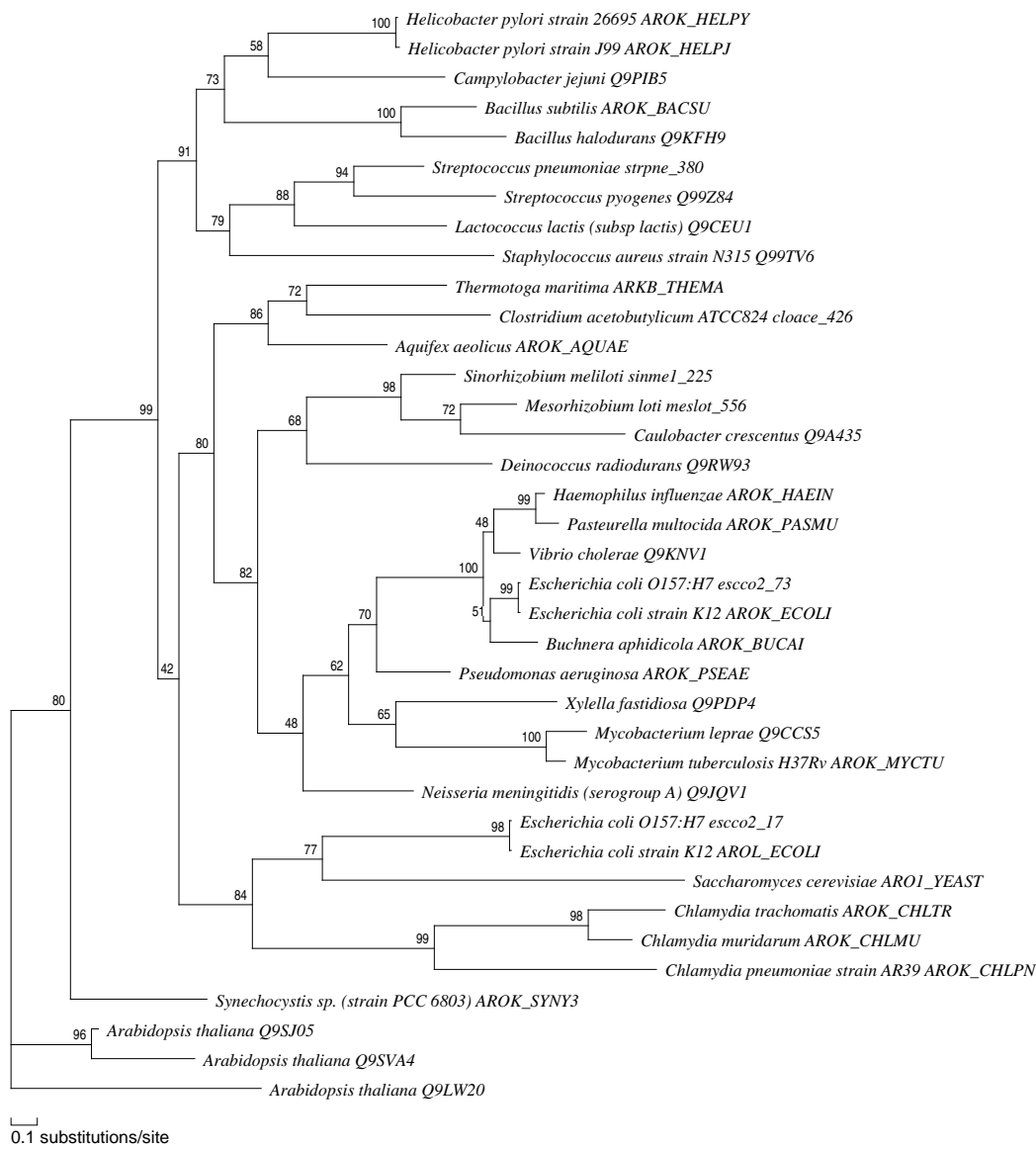


Abbildung A.68: , Shikimatkinase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 69



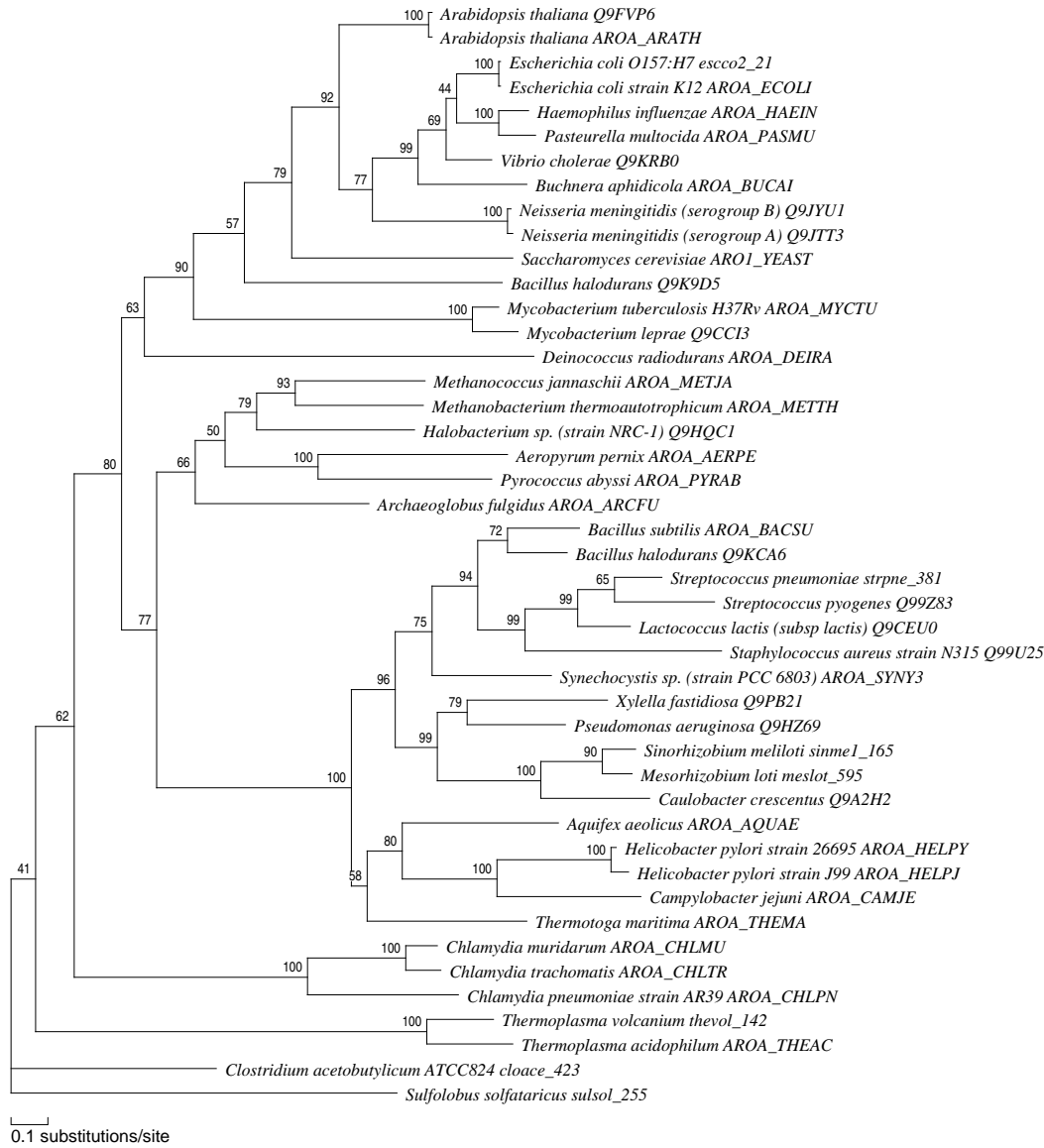


Abbildung A.69: , EPSP-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 70

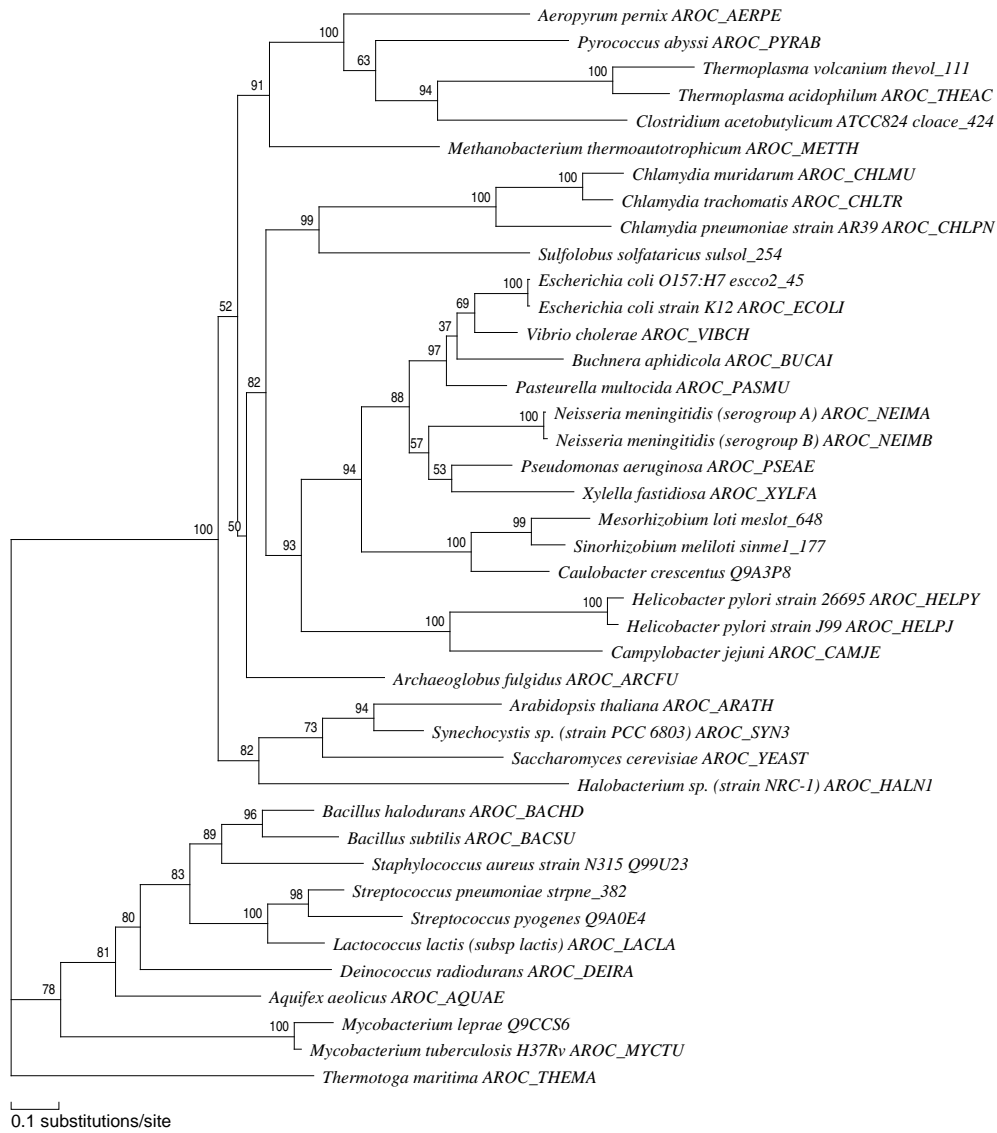
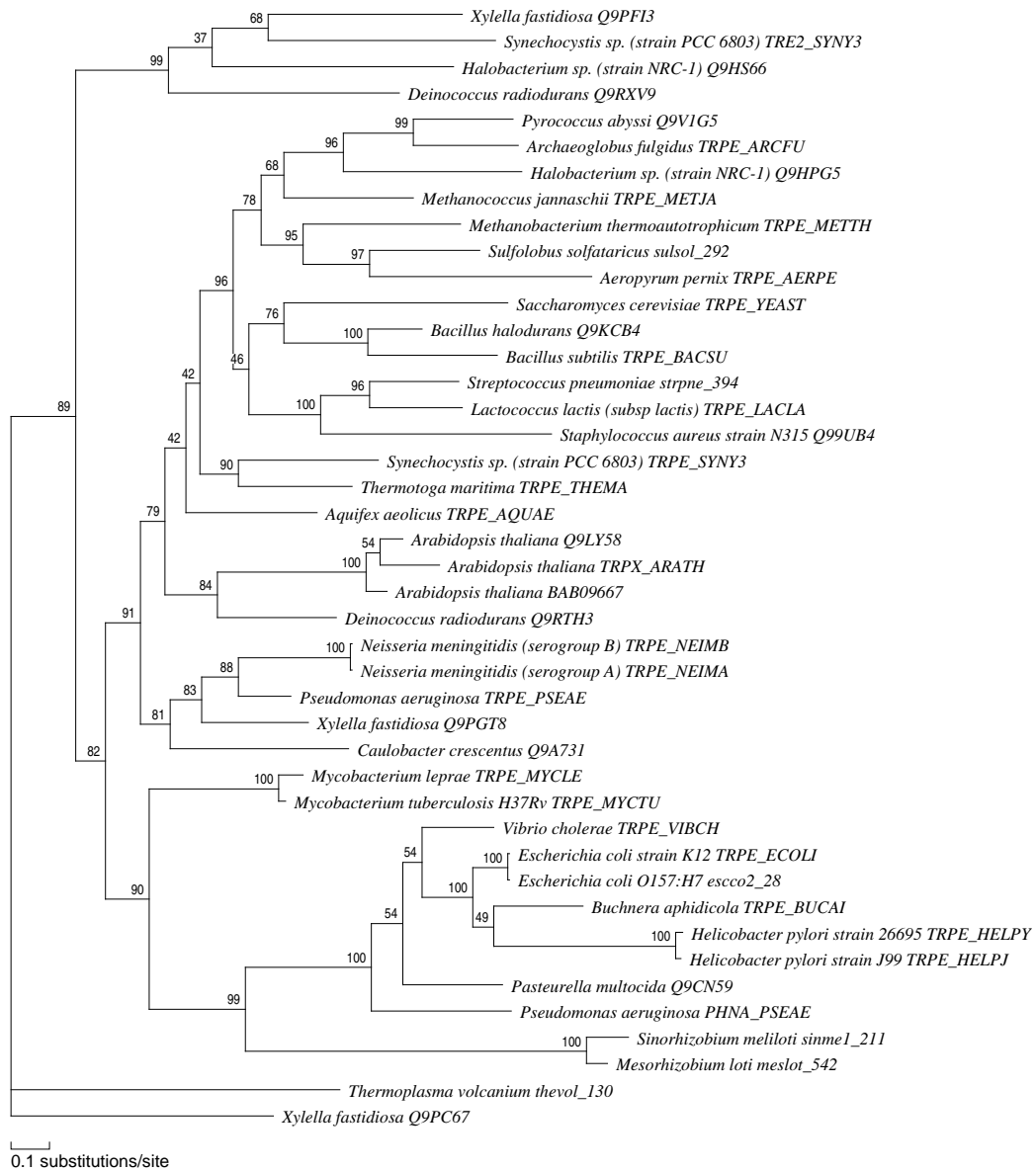


Abbildung A.70: , Chorismatsynthese, siehe Tabelle 3.1 Nr. 71

Abbildung A.71: ,  $\alpha$ -Untereinheit der Anthranilatsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 72

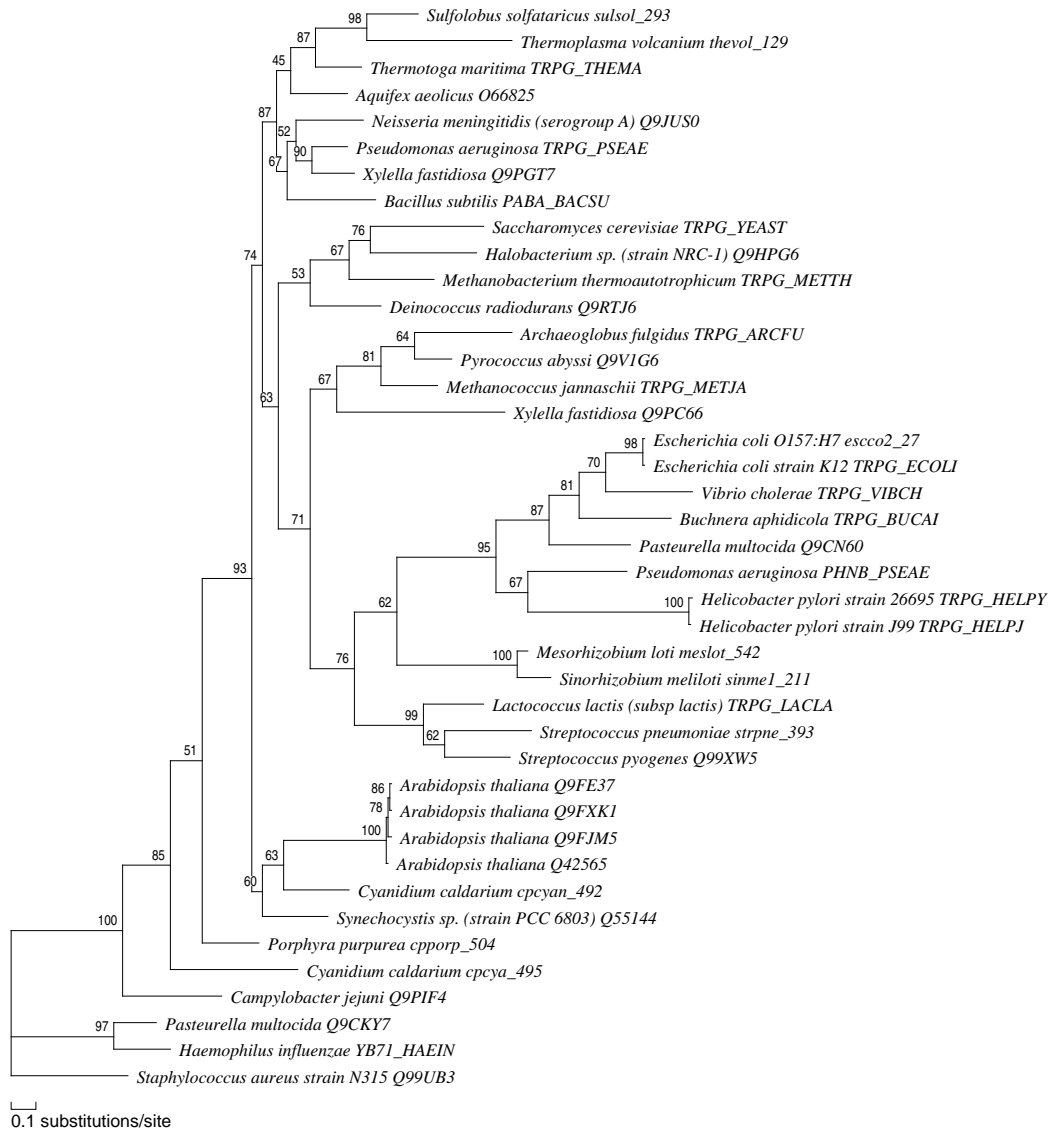


Abbildung A.72:  $\beta$ -Untereinheit der Anthranilatsynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 73

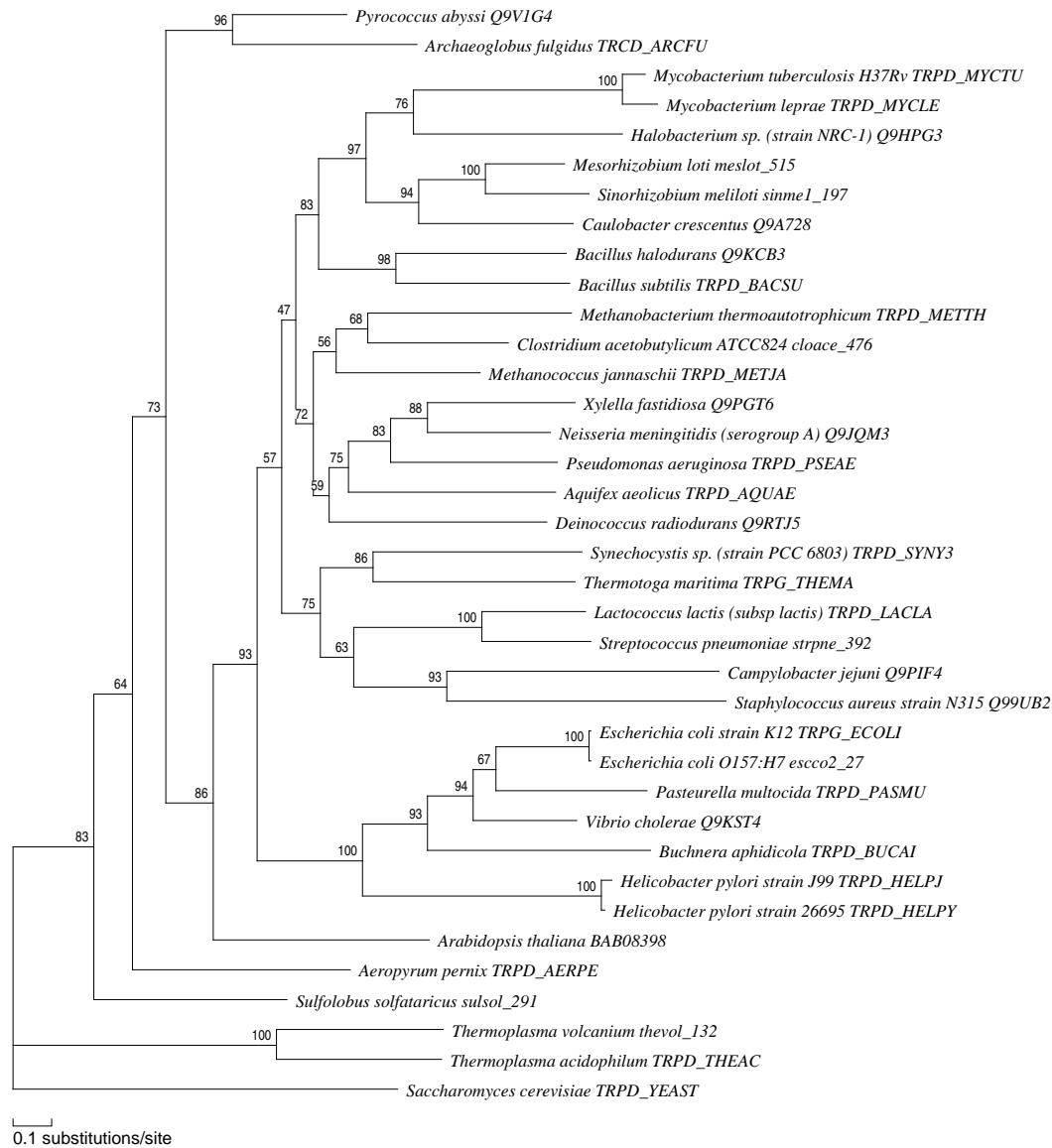


Abbildung A.73: , Anthranilatphosphoribosyltransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 74

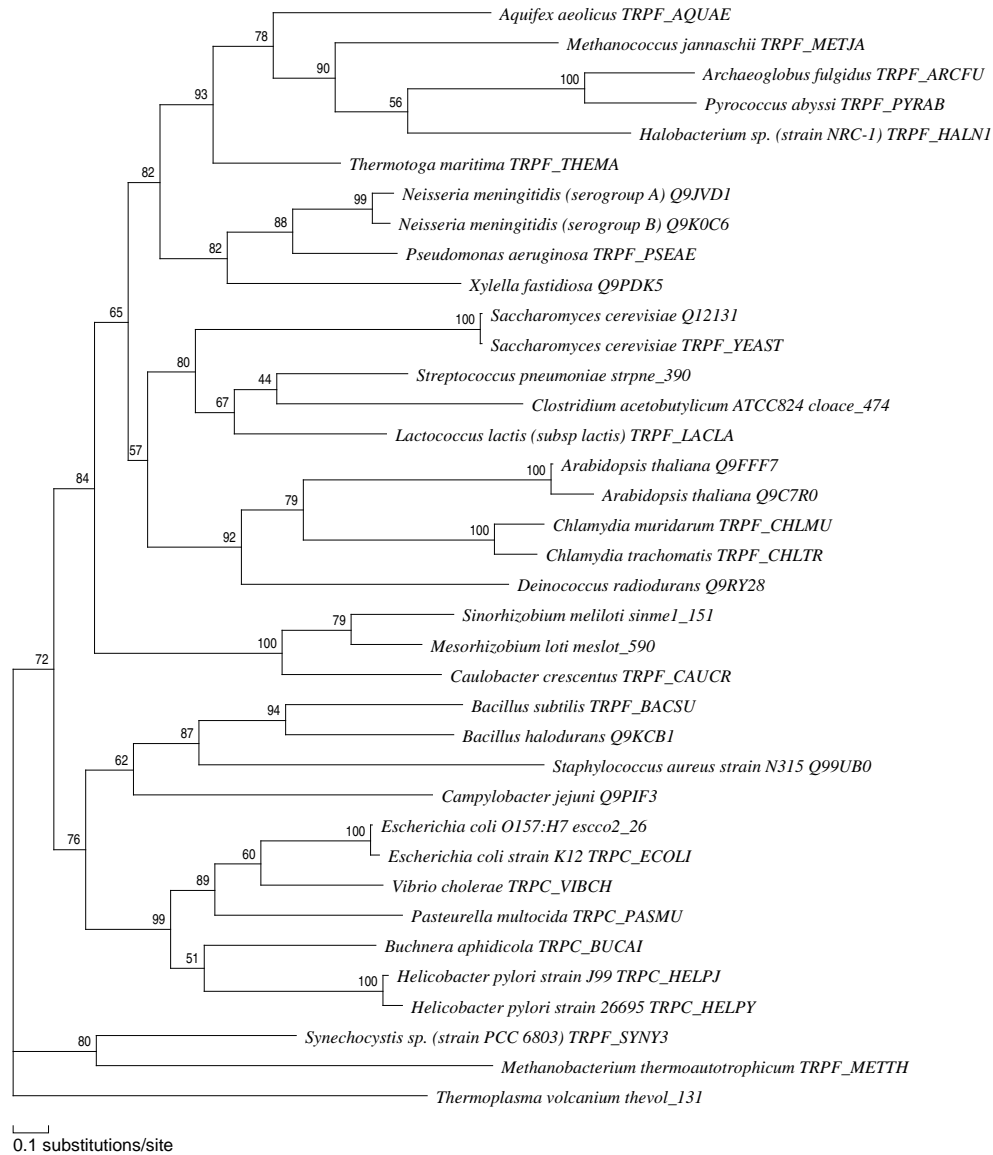


Abbildung A.74: , Phosphoribosylanthranilatisomerase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 75

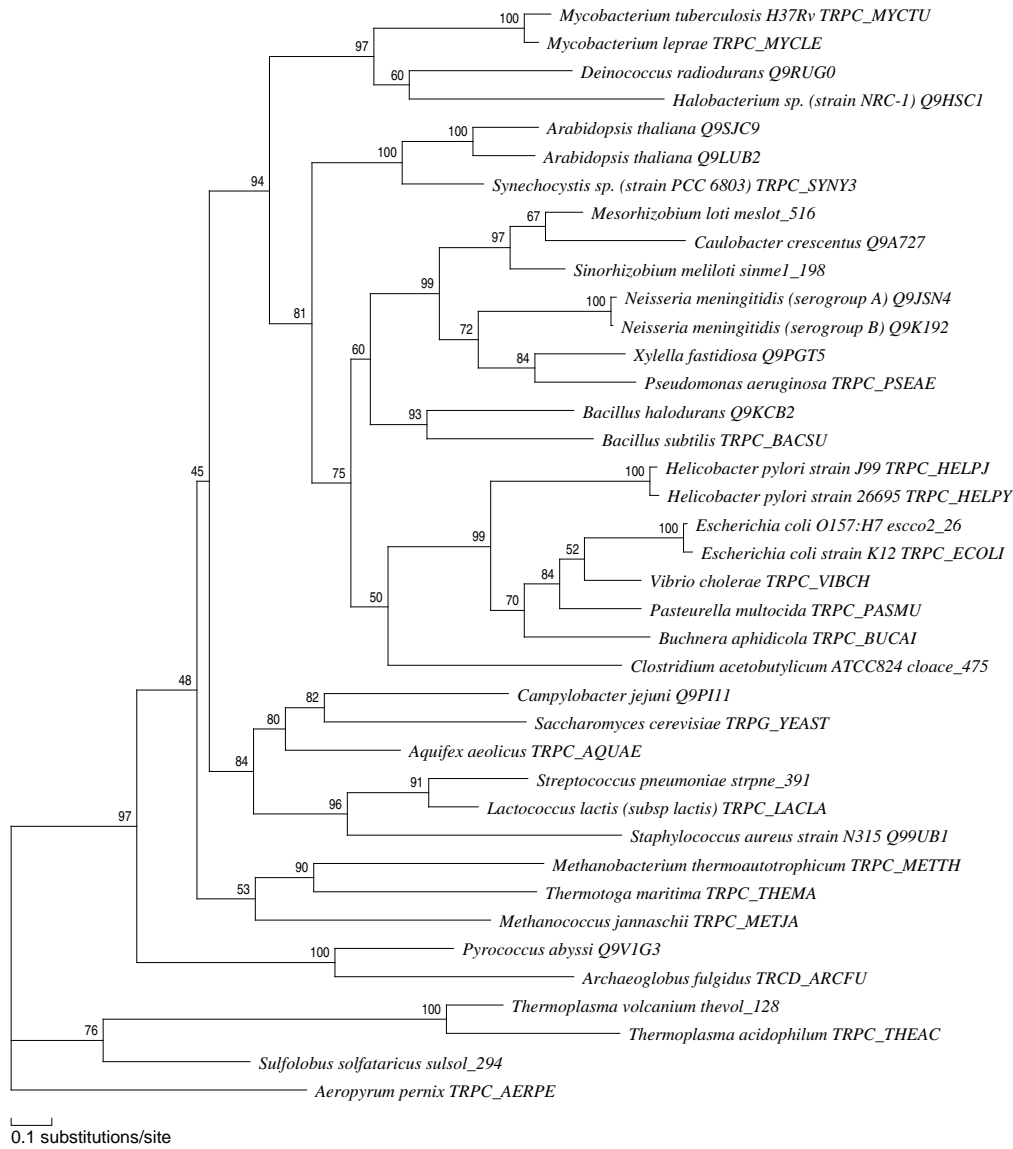


Abbildung A.75: , Indolglycerolphosphat-Synthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 76

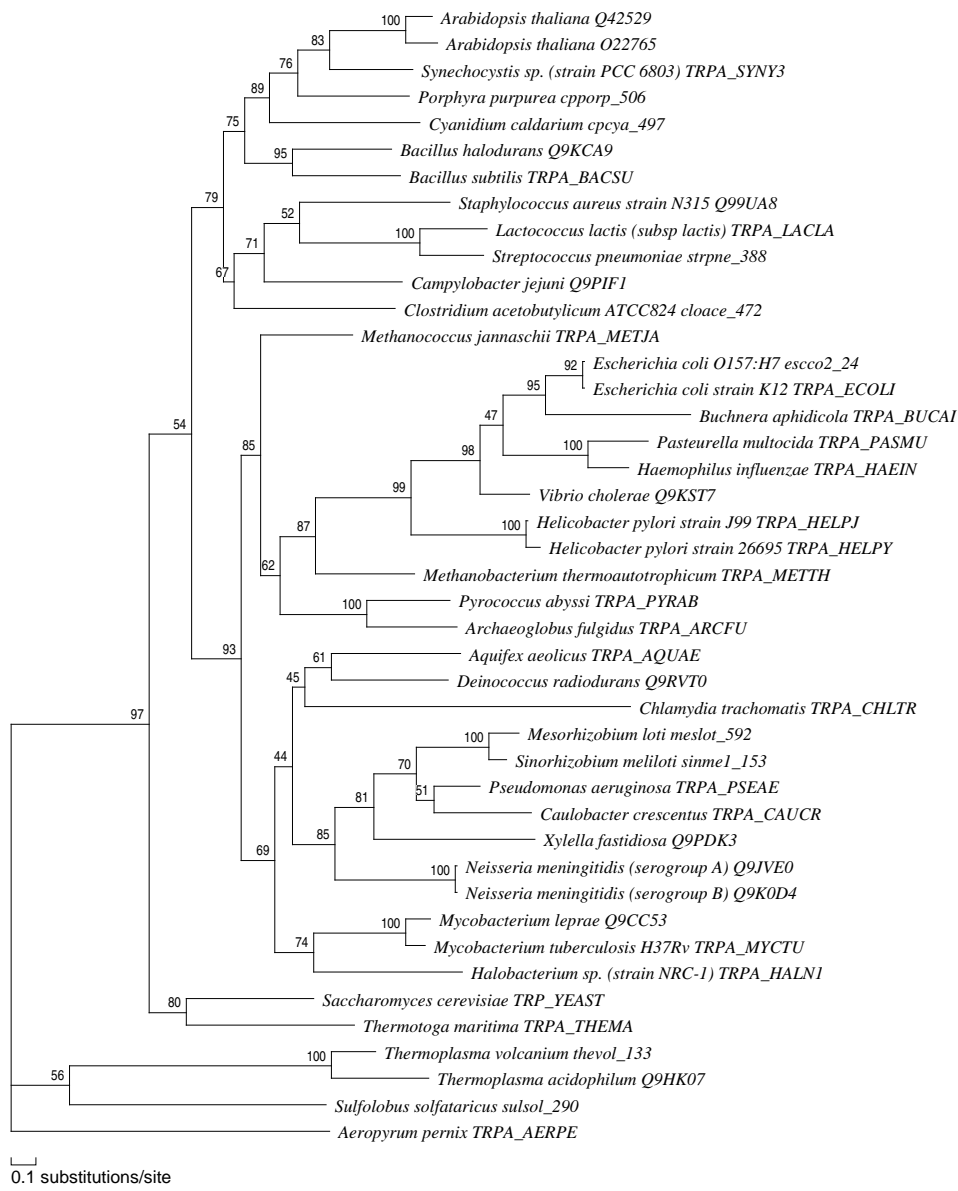


Abbildung A.76: ,  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophansynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 77



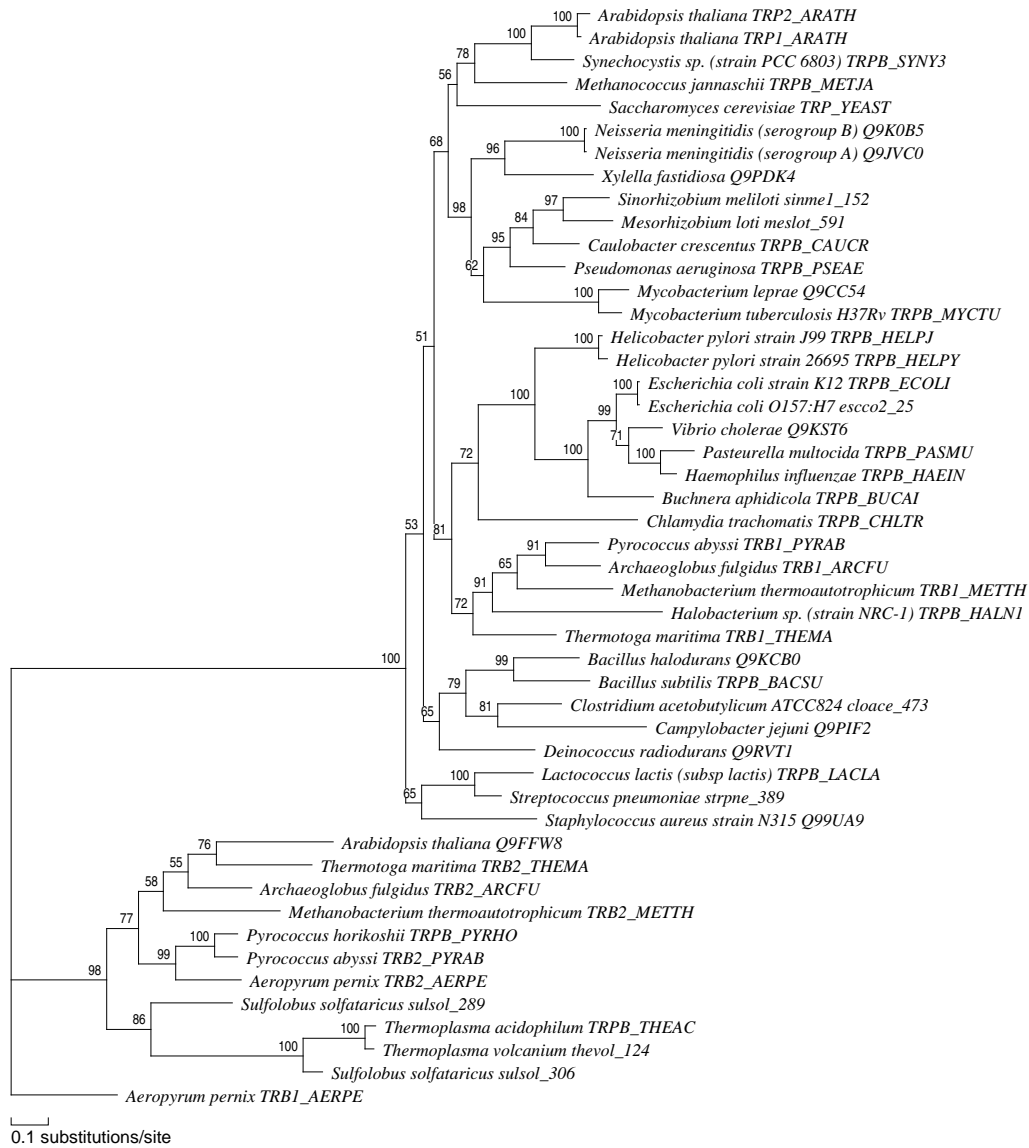


Abbildung A.77:  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophansynthase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 78 und Nr. 79

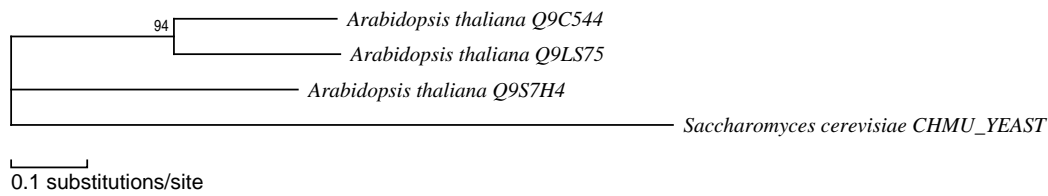


Abbildung A.78: , Chorismatmutase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 80

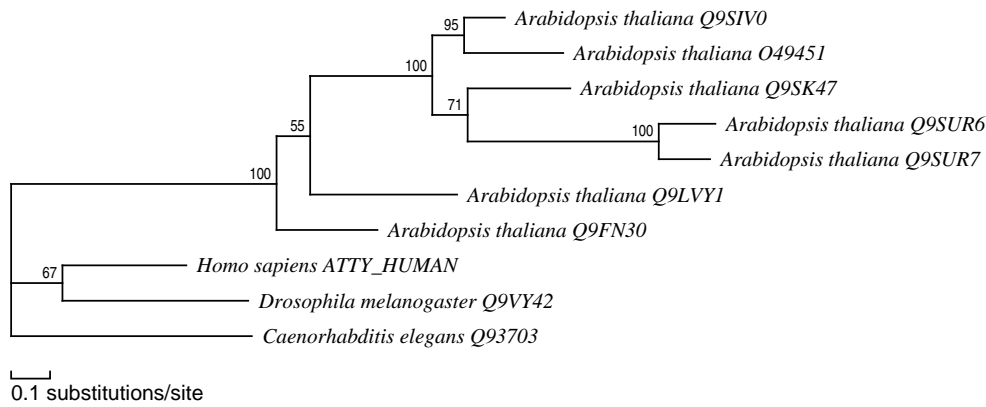


Abbildung A.79: , Tyrosin-Aminotransferase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 83

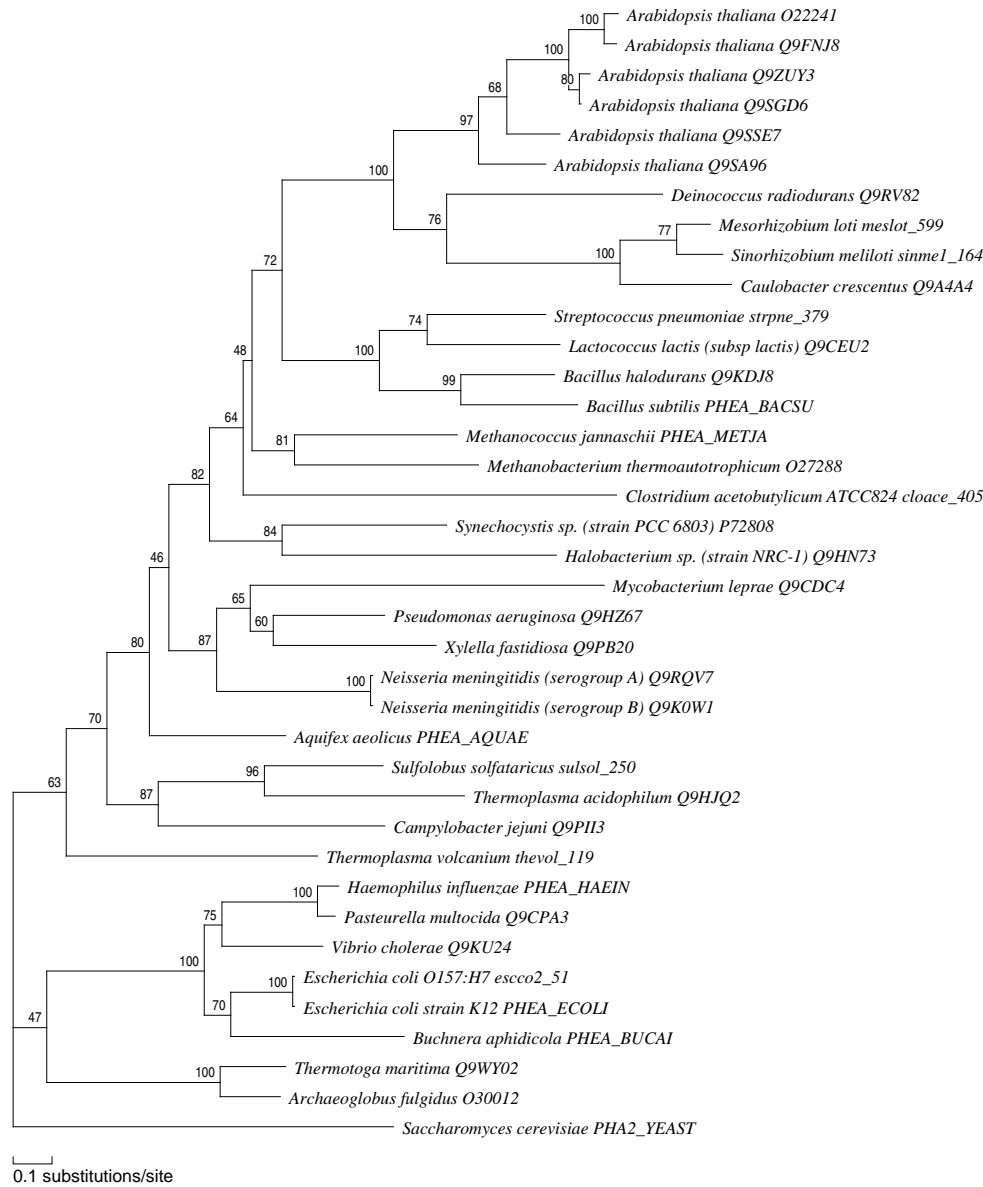


Abbildung A.80: , Chorismatmutase/Prephenatdehydratase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 81

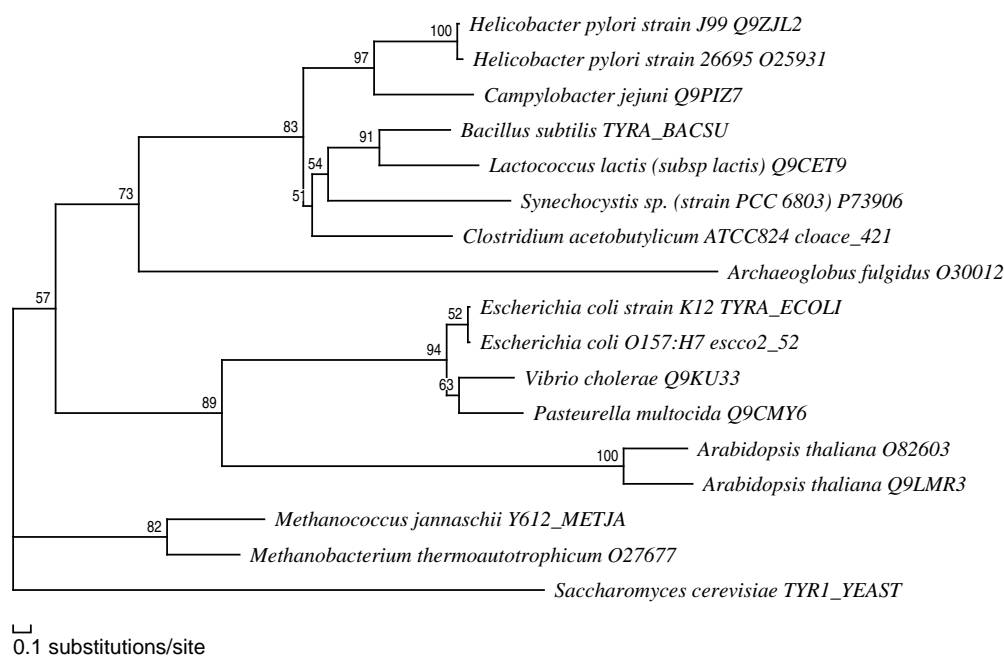


Abbildung A.81: , Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase, siehe Tabelle 3.1 Nr. 82

# B

## Sequenzen verwendeter Primer

### B.1 Oligomere für die Klonierung

Oligosonde für die Homoserinkinase (Position 198 bis 238):

(Accessionnummer AAD33097)

5' CAC CGT CGC TAA TTT AGG ACC AGG GTT TGA TTT CTT AGG A 3'

Oligosonde für die Threonindehydratase (Position 426 bis 466):

(Accessionnummer AAC97936)

5' CGT GGA GCT TAC AAT ATG ATG GTG AAA CTT CCA GCA GAT C 3'

Oligosonde für die Threoninsynthase (Position 895 bis 935):

(Accessionnummer T08545)

5' TGG CGT GAT CTC TTC GAT TCG CGT GTT GGT AAA AGC ACA T 3'

### B.2 PCR-Primer

#### B.2.1 Amplifizierung der N-Acetylglutamatkinase

(Accessionnummer CAB66113)

NAGK forward:

5' ATG GCC ACC GTC ACA TCC AAT GC 3'

NAGK revers:

5' TTA TCC AGT AAT CAT AGT TCC AGC TC 3'

#### B.2.2 Amplifizierung für die Expression

**NAGK**

**Primer für die Klonierung in pet28a ohne Transitpeptid:**

argB\_pet28a\_forward:

```
CAT ATG GCA CCT TCA CCG GAT TAC AG
NdeI A P S P D Y R
```

argB\_pet28a\_revers:

```
CTC GAG TTA TCC AGT AAT CAT AGT TCC
XhoI * G T I M T G
```

## HSK

**Primer für die Klonierung in pet28a mit Transitpeptid:**

hsk\_pet28a\_forward:

```
C ACG CAG TCG CAT ATG ATG GCA AGT CTT TGT TTC C
NdeI M A S L C F
```

hsk\_pet28a\_revers:

```
CT CAG TCA AGA GCT C TCA TCT GGA GAC GCT GTT G
SacI * R S V S N
```

**Primer für die Klonierung in pet28a ohne Transitpeptid:**

hsk\_pet28a\_oT\_forward:

```
ATC ACG CGT CAT ATG GAG CCA GTT TTC GTC TCC
NdeI E P V F V S
```

hsk\_pet28a\_oT\_revers:

```
CT CAG TCA AGA GCT C TCA TCT GGA GAC GCT GTT G
SacI * R S V S N
```

## THD

**Primer für die Klonierung in pet28b mit Transitpeptid:**

thd\_pet28b\_forward:

```
AGC GAG TCG CAT ATG ATG AAT TCC GTT CAG CTT CCG AC
NdeI M N S V Q L P
```

thd\_pet28b\_revers:

```
C CTC TAC CTC GTC GAC TCA GTG CAT CAG AAG CTT
      SalI      *   H   M   L   L   K
```

**Primer für die Klonierung in pet28b ohne Transitpeptid:**  
thd\_pet28b\_oT\_forward:

```
CTC AAG TCG CAT ATG GCG GAA GCT ATG GAG TAT TTG
      NdeI      A   E   A   M   E   Y   L
```

thd\_pet28b\_oT\_revers:

```
C CTC TAC CTC GTC GAC TCA GTG CAT CAG AAG CTT
      SalI      *   H   M   L   L   K
```

## THS

**Primer für die Klonierung in pet28a mit Transitpeptid:**  
ths\_pet28a\_forward:

```
G CTC AAG TCG CAT ATG ATG GCT TCG TCT TGT CTC
      NdeI      M   A   S   S   C   L
```

ths\_pet28a\_revers:

```
A CCG TGC GTC GAG CTC TTA TGA CGT AAG TGT ATT AC
      SacI      *   S   T   L   T   N
```

**Primer für die Klonierung in pet28a ohne Transitpeptid:**  
ths\_pet28a\_oT\_forward:

```
AGC GAG TCG CAT ATG CTC GAC GAG ATC GTG TAC
      NdeI      L   D   E   I   V   Y
```

ths\_pet28a\_oT\_revers:

```
CCA TGC GTC GAG CTC TTA TGA CGT AAG TGT ATT AC
      SacI      *   S   T   L   T   N
```

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Andrea Hansen
Adresse	Herrmann-Hummel-Str. 9 82166 Gräfelfing
Geburtsdatum	18.11.1969
Geburtsort	Schleswig
Familienstand	ledig

### Bildungsweg

1976 - 1989	Grundschule und Gymnasium
1989 - 1991	Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin am Institut für berufliche Aus- und Weiterbildung GmbH & Co. KG in Oldenburg
1991 - 1992	Ausbilderin für Biologielaboranten am Forschungsinstitut für Biologie und Medizin in Borstel (Hamburg)
Okt. 1992 - April 1997	Biologiestudium an der Technischen Universität in Braunschweig, Schwerpunkte im Hauptstudium: Genetik, Botanik, Zellbiologie
April 1997 - April 1998	Diplomarbeit bei PD Dr. William Martin am Institut für Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Rüdiger Cerff Titel der Diplomarbeit: „Charakterisierung eines Abschnittes der Chloroplasten-DNA von <i>Gnetum gnemon</i> .“
seit Mai 1998	Dissertation bei PD. Dr. William Martin an der Technischen Universität in Braunschweig. Mit dem Ruf von Prof. William Martin im November 1999 Umzug nach Düsseldorf und Fortsetzung der Promotion im Landwirtschaftszentrum der Bayer AG in Monheim und an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
März 2001 - Mai 2001	Programmierpraktikum in der Swissprot-Gruppe von Dr. Rolf Apweiler am European Bioinformatics Institute in England, gefördert durch ein Marie-Curie-Stipendium



## **Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Prof. William Martin für die hervorragende Betreuung der Dissertation bedanken.

Ulrike, Sarina, Thomas und allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik der TU Braunschweig möchte ich für die schöne Zeit in Braunschweig danken. Mein besonderer Dank gilt Christiane und Tanja, die mich stets mit Rat und Tat in allen Lebenslagen unterstützt haben und es auch immer noch tun.

In der Abteilung für molekulare Wirkstoffforschung und Biotechnologie im Landwirtschaftszentrum der Bayer AG bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Klaus Tietjen für die Betreuung meiner Arbeit. Seine Tür stand immer offen für all meine Fragen und Probleme. Ich danke auch allen anderen Laborleitern, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Josef, Sabine, Heidi, Claudia, Roland, Kerstin, Stefan, HaJü, Dagmar und allen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung und ihre Hilfsbereitschaft, dank derer ich mich in Monheim immer sehr wohl gefühlt habe. Ohne Euch wäre manches schief gegangen. Bei Sandra und Silke bedanke ich mich für die vielen Stunden, die wir wissenschaftlich aber auch darüber hinaus zusammen verbracht haben. Wir waren wirklich ein gutes Team.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Botanik III an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf danke ich für die schöne Zeit in der Arbeitsgruppe. Bei Katrin möchte ich mich für die Aufnahme in Ihrem Büro und Ihr Verständnis für mein „Tastaturgeklapper“ beim Zusammenschreiben bedanken. Unsere gemeinsamen lustigen, wenn auch schweisstreibenden Stunden auf Crosstrainer & Co. werden mir fehlen.

Olaf hat mich während meiner Promotion mit sehr viel Geduld begleitet und war immer für mich da. Danke.

Meine Eltern haben mir durch Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung diesen Weg ermöglicht. Ohne Sie wäre ich nicht so weit gekommen.